Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik
des Klinikum Steglitz
der Freien Universität Berlin
Geschäftsführender Direktor:
Prof. Dr. med. W. Oelkers

Vergleichende Pharmakokinetik und Serum Bakterizidie von Azlocillin und Moxalactam bei alleiniger und kombinierter Gabe

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Volker Madey
aus Hamburg

1985

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik
des Klinikum Steglitz
der Freien Universität Berlin
Geschäftsführender Direktor:
Prof. Dr. med. W. Oelkers

Vergleichende Pharmakokinetik und Serum Bakterizidie von Azlocillin und Moxalactam bei alleiniger und kombinierter Gabe

Inaugural–Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Volker Madey
aus Hamburg

Referent: Prof. Dr. H. Lode

Koreferent: Prof. Dr. W. Christ

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fachbereiche der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 7.9.85

Inhaltsübersicht Seite

1.	**Einleitung**	1
1.1	Historisches	1
1.2	Struktur der β-Lactam-Antibiotika	2
1.3	Spezielle Chemie der Substanzen	3
1.4	Wirkungsmechanismen	4
1.5	Problem und Aufgabenstellung	4
2.	**Material und Methodik**	6
2.1	Experimentelle Untersuchungen	6
2.1.1	Probanden und Versuchsanordnung	6
2.1.2	Pharmazeutische Zubereitungen	7
2.1.3	Gewinnung des Untersuchungsmaterials	8
2.1.4	Agardiffusionsverfahren	9
2.1.4.1	Allgemeine Vorbemerkungen	9
2.1.4.2	Arbeitsgang	11
2.1.4.3	Auswertung	13
2.1.4.4	Durchführung	14
2.1.4.5	Analytische Zuverlässigkeit	16
2.1.5	Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie (HPLC)	22
2.2	Serum Bakterizidie (SBA)	26
2.2.1	Allgemeine Vorbemerkungen	26
2.2.2	Vorgehensweise	26
2.2.2.1	Voruntersuchungen	26
2.2.3	Durchführung der SBA	31
2.2.4	Auswertung	34
2.3	Pharmakokinetisches Modell und Berechnungen	35
3.	**Ergebnisse**	39
3.1.1	Azlocillin Einzeldosierung	39
3.1.2	Moxalactam Einzeldosierung	40
3.1.3	Azlocillin in Gegenwart von Moxalactam	40
3.1.4	Moxalactam in Gegenwart von Azlocillin	41
3.2	HPLC-Ergebnisse	42
3.3	Serum Bakterizidie	42
3.3.1	Azlocillin Einzelapplikation	44

3.3.2	Moxalactam Einzelapplikation	47
3.3.3	Azlocillin und Moxalactam in gemeinsamer Applikation	51
3.4	Verträglichkeit	54
4.	**Diskussion**	55
4.1	Pharmakokinetik	55
4.1.1	Azlocillin	55
4.1.2	Azlocillin in Kombination mit Moxalactam	57
4.1.3	Moxalactam	59
4.1.4	Moxalactam in Kombination mit Azlocillin	60
4.2	Vergleich der analytischen Zuverlässigkeit und Praktikabilität von Bioassay und HPLC-Methode	62
4.2.1	Azlocillin	62
4.2.2	Moxalactam	62
4.3	Serum Bakterizidie	63
4.3.1	Allgemeine Bemerkungen zur antimikrobiellen Wirkung von β-Lactam-Antibiotika	63
4.3.2	Struktur - Wirkungsbeziehungen	69
4.3.2.1	Azlocillin	70
4.3.2.2	Moxalactam	71
4.3.3	Mikrobiologie	73
4.3.3.1	Enterobacteriaceae	73
4.3.3.2	E. coli	74
4.3.3.3	Klebsiella oxytoka	75
4.3.3.4	Enterobacter sakazakii	76
4.3.3.5	Proteus mirabilis	76
4.3.3.6	Streptococcus faecalis	77
4.3.3.7	Pseudomonas aeruginosa	78
4.3.4	Kritik zur Methode der Serumbakterizidiebestimmung	79
4.3.5	Kombination von β-Lactam-Antibiotika	87
4.3.6	Interpretation der Serumbakterizidie	94
4.3.6.1	Synoptische Betrachtungen von Bioassay und Serum Bakterizidie	95
5.	**Zusammenfassung**	102
Anhang	Tabellen 1 - 29	
	Quellenverzeichnis	

1. Einleitung

1.1 Historisches

Seit Paul EHRLICH 1906 (49) die antibakterielle Wirkung einer Substanz mit dem Begriff "Chemotherapie" für die experimentelle und klinische Forschung definierte, verstehen wir darunter die monokausale, selektiv gegen den Erreger gerichtete Behandlung mit einem spezifischen Arzneimittel.

Im Jahre 1928 beobachtete A. FLEMMING (55) bei einem Staphylokokkenstamm die Hemmung des Wachstums durch einen Schimmelpilz. Das wirksame Prinzip nannte er bereits Penicillin. Die Publikation dieser Entdeckung fand jedoch keine Resonanz. Erst im Jahre 1939 wurde das Problem von FLOREY und CHAIN in der sogenannten Oxford-Gruppe (57) aufgegriffen, denen 1940 die Isolierung von Penicillin aus Kulturen von Penicillium notatum gelang. Damit begann im eigentlichen Sinne die Ära der Antibiotika.

Die großtechnische Gewinnung von Penicillin erfolgte während des 2. Weltkrieges in den USA. Erst nach Kriegsende wurde Penicillin für die Therapie allgemein zugänglich. Die Isolierung des Grundkörpers aller Penicilline, der 6-Amino-Penicillansäure, durch BATCHELOR (19) aus dem Kulturmedium von Penicillium chrysogenum hatte für die Entwicklung der neuen halbsynthetischen Penicilline große Bedeutung. Der erste, wichtigste Vertreter der Penicilline im therapeutischen Einsatz wurde das Penicillin G, ein Benzylpenicillin, das heute total synthetisch hergestellt werden kann. Lag die Wirkungsintensität des Bencylpenicillins vor allem im grampositiven Bereich, so wurde das Wirkungsspektrum Anfang der sechziger Jahre mit neuen Breitspektrumpenicillinen vom Typ des Ampicillin sowohl im grampositiven als auch gramnegativen Bereich erweitert. Das Ampicillin ist ein halbsynthetisches Penicillinderivat, dessen Seitenkette sich nur durch eine zusätzliche Aminogruppe am Bencylrest vom Penicillin G unterscheidet. Die Entwicklung von halbsynthetischen Penicillinen mit größerer Wirksamkeit gegen gramnegative Problemkeime wie Pseudomonas aeruginosa und indolpositive Proteusarten führte über das Carbenicillin (mit einer zweiten Carboxylgruppe in der Seitenkette anstelle der Aminogruppe des Ampicillins) neben anderen zum Azlocillin.

Die zweite untersuchte Substanz, das Moxalactam*, geht in seiner chemischen Struktur auf das Cephalosporin C aus Cephalosporium acremonium zurück. Dieses erste Cephalosporin wurde 1955 von der Arbeitsgruppe um ABRAHAM (1,2) beschrieben, nachdem BROTZU (32) bereits 1945 erste Extrakte aus Kulturflüssigkeiten des Cephalosporium acremonium isolierte. Natürliches Cephalosporin hat wegen seiner schwachen antibakteriellen Wirksamkeit keine therapeutische Bedeutung erlangt. Der Arbeitsgruppe um CHAUVETTE, FLYNN und MORIN (36) gelang 1962 die semisynthetische Verbesserung dieser penicillinähnlichen natürlichen Substanz. Sie stellten die 7-Aminocephalosporansäure (7-ACS) als Syntheseausgangsstoff zur Verfügung.

1.2 Struktur der β-Lactam-Antibiotika

Da die 7-ACS ebenfalls antimikrobiell fast unwirksam ist, sind durch Acetylierungsreaktionen hochwirksame Cephalosporinantibiotika hergestellt worden, die zusammen mit den Penicillinen wegen des gemeinsamen β-Lactam-Ringsystems zur Gruppe der β-Lactamantibiotika zusammengefaßt werden. Diese Cephalosporinderivate sind vom gleichen Wirkungstyp wie die Penicilline, d.h. es werden ähnliche Angriffspunkte in der Bakterienzellwand für die Mureinsynthese postuliert. Aus diesem hochspezifischen Wirkungsmuster leitet sich die den Penicillinen ähnliche geringe Toxizität ab. Anders als die Penicilline verfügen die Cephalosporinderivate über weitgehende Stabilität gegenüber Penicillinase diverser Erreger. Außerdem sind sie gegen die Mehrzahl der gramnegativen Erreger wirksam. Parallelsensibilität für penicillinüberempfindliche Patienten besteht im allgemeinen nicht. Unterschiedliche Eigenschaften von Cephalosporinderivaten und Penicillinen ergeben sich aus dem verschiedenen Aufbau des dem β-Lactam-Ring ankondensierten Ringsystems. Bei den Penicillinen ist es der fünfgliedrige Thiazolidinring, der die sterische Stabilität des β-Lactam-Ringes mit bedingt; die Cephalosporine sind an dieser Stelle mit einem sechsgliedrigen Dihydrothiazinring versehen.

*) Zum Zeitpunkt der Untersuchungen war der Generic-Name Moxalactam, er wurde 1983 durch Latamoxef ersetzt. In dieser Arbeit wurde der ursprüngliche Name beibehalten.

1.3 Spezielle Chemie der Substanzen

Die Cephalosporinderivate sind durch ihre spezifische β-Lactam-Ringstruktur nicht wesentlich säurestabiler als die Penicilline. Sie werden in ihrer Bio-Verfügbarkeit durch mangelnde Resorption im Gastrointestinaltrakt eingeschränkt. Die Entwicklung von oral applizierbaren Cephalosporinen wurde mit Cephaloglycin, Cephalexin und Cephaclor vorangetrieben; sie haben ihre klinische Bedeutung als follow-up-Therapie nach parenteraler Behandlung von Infektionen oder bei schweren Infektionen. Vorzugsweise werden hochwirksame Cephalosporinen heute parenteral appliziert.

Moxalactam

Die speziellen Struktur-Wirkungsbeziehungen der Substanz soll die Abbildung 2 wiedergeben. Die Substanz unterscheidet sich strukturchemisch durch den Austausch eines Schwefelatoms im Grundgerüst gegen ein Sauerstoffatom von den Cephalosporinen. Es entsteht so ein Oxa-β-Lactam-Grundgerüst. Diese Struktur hat mit der Reihe der Cephalosporine, die von den in der Natur vorkommenden Cephalosporium-acremonium herleiten, keine direkte Verwandtschaft mehr. Auf Grund dieses Unterschiedes bestehen weniger Kreuzallergien und Kreuzresistenzen mit Penicillinen und Cephalosporinen (142). Moxalactam liegt als Di-Natriumsalz vor. Die Eiweißbindung beträgt ca. 40%. Im Urin finden sich nach parenteraler Applikation zwischen 60 und 90% der verabreichten Dosis in aktiver Form innerhalb von 24 Stunden wieder.

Azlocillin

Die Substanz wird parenteral appliziert. Sie liegt als 6-((R)-2-(2-Oxoimidazolidin-1-carboxamido)-2-phenylacetamido) Penicillansäure vor. Die Serumeiweißbindung beträgt ca. 30%. Die Urinausscheidung antimikrobiell aktiver Form liegt zwischen 55 und 65% der verabreichten Dosis. Von besonderer Bedeutung ist die im Vergleich zu Carbenicillin 4-8fache höhere Aktivität gegen Pseudomonas aeruginosa. Azlocillin ist penicillinaseempfindlich. Die chemische Struktur zeigt die Abbildung 1.

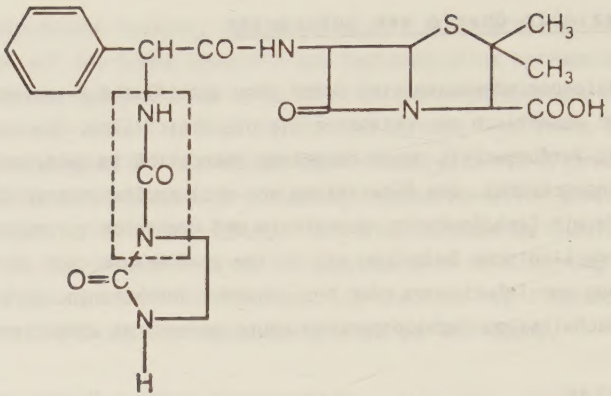


Abb. 1 Chemische Struktur von AZLOCILLIN.

Summenformel: $C_{20}H_{22}N_5O_6SNa$

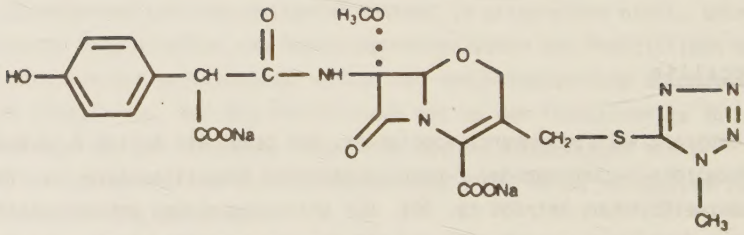


Abb. 2 Chemische Struktur von MOXALACTAM.

Summenformel: $C_{20}H_{18}N_6O_9SNa_2$

1.4 Wirkungsmechanismen

Für die β-Lactamen-Antibiotika wird ein einheitlicher Wirkungsmechanismus angenommen. Sie greifen in die Synthes der Bakterienzellwand ein und wirken damit selektiv auf die Krankheitserreger. Nach STROMINGER (199) geht das β-Lactam-Antibiotikum mit einem zur Bakterienzellwandsynthese notwendigen Enzym, der sogenannten Transpeptidase, eine feste Verbindung ein, so daß das natürliche Substrat dieses Enzyms, die D-Alanyl-D-Alanin-Einheit, nicht von dem strukturell ähnlichen Chemotherapeutikum unterschieden werden kann. Durch den so entstehenden Zellwanddefekt des Bakteriums kommt es zur Lyse der Zelle. Die β-Lactam-Antibiotika wirken dementsprechend nur in der Wachstumsphase der Bakterien, dabei jedoch bakterizid. SPRATT (193) zeigte 1980, daß neben diesem Mechanismus eine Reihe weiterer Bindungskomponenten besteht. Die Bindungseigenschaften gegenüber den in der Zytoplasmamembran gelegenen diversen Penicillin-Bindungsproteinen (PBP's) sind nach heutiger Auffassung für unterschiedliche Wirkungsqualität und -intensität zwischen Penicillinen und Cephalosporinen, aber auch innerhalb dieser Gruppen verantwortlich.

1.5 Problem und Aufgabenstellung

Neben der selektiven Antibiotikatherapie mit Einzelsubstanzen gegen bakterielle Erreger haben sich unter speziellen Umständen Antibiotika-Kombinationen bewährt. Hier sind als Indikationen neben der Tuberkulose besondere Formen von infektiöser Endokarditis sowie Infektionen mit gramnegativen Bakterien bei neutropenischen oder ähnlich abwehrgeschwächten Patienten zu nennen (218). Auch polymikrobielle Prozesse, häufig unter Beteiligung von Anaerobiern und schwere , lebensbedrohlichen Infektionen, bei denen die Erregerisolierung noch nicht möglich war, sollten einer Kombinations-Therapie zugeführt werden.
Die Auswahl der zur Kombination geeigneten Substanzen läßt sich nur anhand von überprüfbaren Ergebnissen angemessener in vitro bzw. in vivo Bestimmungsmethoden treffen. Generell kommen dabei nur solche Kombinationen in Frage, die entweder das antibakterielle Spektrum gegenüber der Einzelapplikation erweitern oder zusammen einen synergistischen Effekt aufweisen (31). Neben reinen in vitro Versuchsanordnungen wie Checkerboard und Bakterienkinetiken sowie Agar-Diffusionstests gibt die Bestimmung der Serum-

Bakterizidie zusätzliche Informationen (218). Die Serum-Bakterizidie-Methode (SBA) bietet dabei die Möglichkeit, auf Grund ihrer weitgehend den in vivo Bedingungen angepaßten Verhältnissen, Therapieerfolge objektiver zu beurteilen.

Bis vor einigen Jahren wurden vornehmlich Kombinationen von Aminoglycosiden mit Penicillinen verwendet, die besonders günstige Wirkungssteigerung gezeigt haben. Einige Autoren errechneten einen Synergismus in der Effizienz dieser Antibiotikakombinationen (100). Vor allem die Nebenwirkungen der Aminoglycoside wie Nephrotoxizität und Ototoxizität veranlaßten die Erprobung neuer Kombinationen von antimikrobiellen Substanzen, speziell der β-Lactam-Antibiotika.

Neben Veröffentlichungen von WADE und SCHIMPFF (219), die 1982 über eine geringere Erfolgsquote bei der Anwendung von zwei β-Lactam-Antibiotika gegenüber der Kombination mit Aminoglykosiden berichteten, stellte SCHIMPFF (220) in einer prospektiven Studie bei Kombinationen von Moxalactam mit Piperacillin gleichwertige Erfolge wie bei Ansätzen mit Aminoglykosiden fest.

In unseren Versuchen wurde die Kombination von einem Penicillin (Azlocillin) mit einem Cephalosporin (Moxalactam) untersucht. Dabei wurde auf Grund der sterischen Verwandtschaft beider Substanzen der Untersuchungsschwerpunkt auf einen möglichen Antagonismus bzw. synergistische Effekte in den serumbakteriziden Eigenschaften und im Hinblick auf mögliche gegenseitige Beeinflussung bei der Ausscheidung, auf die pharmakokinetischen Parameter beider Substanzen in der gemeinsamen Applikation gelegt.

2. Material und Methodik

2.1 Experimentelle Untersuchungen

2.1.1 Probanden und Versuchsanordnung

Vor den Untersuchungen wurden alle 10 Probanden ärztlich untersucht und ein ausführliches Laborprogramm angeordnet. Es wurde ein Blutbild von allen Probanden erstellt, weiterhin Transaminasen sowie die alkalische Phosphatase bestimmt. Außerdem wurden Kreatinin sowie Na^+ und K^+ im Serum bestimmt. Das Resultat der Untersuchungen lag bei allen Probanden im Normbereich (Tabelle 29). Gravidität oder die Einnahme von Ovulationshemmern wurde bei allen Probandinnen ausgeschlossen. Allergien gegen Penicilline oder Cephalosporine ließen sich anamnestisch nicht feststellen. Vor Versuchsbeginn wurde nach ausführlicher Aufklärung über die möglichen Risiken des Versuchs von allen Teilnehmern eine schriftliche Einverständniserklärung abgegeben.

Versuch A

In einer intraindividuellen Vergleichsstudie wurde 10 gesunden Normalpersonen, 5 Frauen und 5 Männer im Alter von 23 bis 45 Jahren (Mittelwert 33,1 Jahre) mit einem Körpergewicht von 63,2 bis 84,5 kg (Mittelwert 70,8 $\pm$ 6,3 kg) einmalig eine Dosis von 5 g Azlocillin, gelöst in 50 ml Aqua zur Injektion mit dem Perfusorautomaten (Fa. Braun, Melsungen) über 15 Minuten konstant intravenös appliziert. Dabei kam eine Butterflykanüle (Venofix) zur Anwendung. Darauf wurde kontinuierlich die Serumkonzentration sowie die Urinausscheidung in den ersten 24 Stunden gemessen. Exakte Entnahmezeitpunkte waren: Direkt nach der Infusion 5', 10', 20', 30', 45', 60', 90', 2 h, 3 h, 4 h, 6 h, 8 h und 10 h. Die Urinsammelperioden reichten von 0-4 h, 4-8 h, 8-12 h und 12-24 h. Die Versuchsteilnehmer bekamen die Kurzinfusion morgens zwischen 7.00 und 8.00 Uhr. Sie tranken schon vor Beginn der Infusionen bis 2 Stunden danach einen Liter Mineralwasser. Nach 2 Stunden war die erste Nahrungsaufnahme vorgesehen.

Versuch B

Unter den obengenannten Bedingungen wurde demselben Probanden-Kollektiv zwei Wochen nach dem Versuch A eine Dosis von 2 g Moxalactam intravenös (gelöst in 50 ml isotoner Kochsalzlösung) mit dem Perfusorautomaten über 15 Minuten konstant appliziert.

Versuch C

Zwei Wochen nach Ablauf von Versuch B wurde wieder demselben Probanden-Kollektiv eine kombinierte Dosis von 5 g Azlocillin (gelöst in Aqua zur Injektion) und 2 g Moxalactam (gelöst in isotoner Kochsalzlösung) mit zwei gleichzeitig laufenden Perfusorautomaten und einem Doppelanschlußschlauchsystem, durch eine Butterflykanüle über 15 Minuten appliziert. Die weiteren Versuchsbedingungen waren wie unter A beschrieben.

2.1.2 Pharmazeutische Zubereitungen

Folgende Antibiotikachargen und Lösungsmittel standen im Rahmen der Versuche zur Verfügung:

1) Versuch A

Azlocillin:	Securopen 5 g Lot. FA 1383 G Fa. Bayer, Leverkusen	
und	Aqua pur Injektion	50 ml

2) Versuch B

Moxalactam:	Moxalactam 2 g Lot. AX 5 RL 84 A Fa. Ely Lilly, Lahn-Gießen	
und	isotone Kochsalzlösung	50 ml

3) Versuch C

Azlocillin:	Securopen 5 g Lot. FA 1383 G Fa. Bayer, Leverkusen	
und	Aqua pur Injektion	50 ml

noch zu 3) Versuch C

Moxalactam: Moxalactam 2 g Lot. AX 5 RL 84 A
Fa. Ely Lilly, Lahn Gießen
und isotone Kochsalzlösung 50 ml.

2.1.3 Gewinnung des Untersuchungsmaterials

Blutproben: Versuch A: 5 g Azlocillin.

Zur Konzentrationsbestimmung der verabreichten Antibiotika im Serum wurden jeweils 10 ml Blut durch einen kontralateral der Infusionskanüle liegenden Kurzkatheder (Venofix) oder direkt aus einer Armvene entnommen. Sofern nach dem vorherigen Entnehmen isotone Kochsalzlösung nachgespritzt wurde, wurden die ersten 3 ml der nachfolgenden Entnahme verworfen.

Entnahmezeiten: Vor der Infusion (Leerwert)
direkt nach der Infusion,5', 10', 15', 20', 30', 45', 60', 90', 2 h, 3 h, 4 h, 6 h, 8 h und 10 Stunden nach Ende der Infusion.

Das Blut wurde nicht länger als eine Stunde im Kühlschrank in sterilen Kunststoffröhrchen (PPN 17/100 Fa. Greiner, Nürtingen) zur Gerinnung aufbewahrt. Anschließend wurde bei 4° C in einer Kühlzentrifuge (10 Minuten 4000 U/min) das Serum abzentrifugiert. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Seren sofort bei minus 80° C tiefgefroren.

Blutproben: Versuch B: 2 g Moxalactam.

Zusätzlich zu dem unter Versuch A beschriebenen Modus wurde bei Versuch B eine pH-Stabilisierung der Proben vorgenommen. So wurden je 2 ml der Proben nach dem Zentrifugieren in ein bereits mit Sörensen Phosphatpuffer (10fach konzentriert, pH 6,0 , 0,25 ml) vorgelegtes steriles Plastikröhrchen überpipettiert und darauf sofort bei minus 80° C tiefgefroren.

Blutproben: Versuch C: 5 g Azlocillin plus 2 g Moxalactam.

Bei Versuch C wurde grundsätzlich wie bei Versuch A und - wegen der Kombination - zusätzlich nach den für Versuch B gültigen Bedingungen verfahren. Außerdem wurden wegen der langen Halbwertzeit des Moxalactams in der Kombination mit Azocillin 2 Blutentnahmen zu den Zeitpunkten 12 und 24 Stunden nach der Infusion ergänzt.

Urinproben:

Jeweils am Tage vor den Versuchen sowie vor Versuchsbeginn wurde eine Urinprobe von den Probanden zur Leerwertbestimmung abgegeben. Keiner der Probanden zeigte im Urin antibakterielle Aktivitäten. Nachdem die Probanden unmittelbar vor der Infusion die Blase entleert hatten, wurde der Urin während der folgenden 24 Stunden in 4 Portionen gesammelt:

1. Periode 0 bis 4 Stunden nach Infusion
2. Periode 4 bis 8 Stunden nach Infusion
3. Periode 8 bis 12 Stunden nach Infusion
4. Periode 12 bis 24 Stunden nach Infusion.

Die Sammelportionen wurden bis zur Bearbeitung im Kühlschrank (+4° C) aufbewahrt. Die Mengen wurden, so weit wie möglich (0 bis 12 Stunden) noch am selben Versuchstag gemessen, nach Durchmischung der Proben zur Konzentrationsbestimmung abgefüllt und bei minus 80° C tiefgefroren. Am Morgen des Versuchstages wurde der Standard zur Bestimmung der Serumkonzentration angesetzt und zusammen mit den Serum- und Urinproben bei minus 80° C tiefgefroren.

2.1.4 Agardiffusionsverfahren

2.1.4.1 Allgemeine Vorbemerkungen

Die Bestimmung der Antibiotikakonzentrationen erfolgte im Agardiffusionstest (21, 107, 145). Dieser Methode liegt folgendes Prinzip zugrunde: In eine mit Bakteriensporen oder vegetativen Keimen besäte Agarplatte werden kreisrunde Löcher eingestanzt, in die die Testlösung eingefüllt wird; an-

schließend erfolgt die Bebrütung der Platte. Der Durchmesser der Wachstumshemmhöfe wird gemessen und durch Vergleich der Hemmhöfe der Testlösungen mit denen bekannter Standardlösungen die Konzentration ermittelt. Der Hemmhofdurchmesser wird von der Art des Antibiotikums und von folgenden Größen bestimmt:

a) Von der absoluten Menge der Flüssigkeit, die in das Loch gebracht wird - bei randvoller Füllung ist der Hemmhof am größten -

b) von der Konzentration des Antibiotikums der eingefüllten Flüssigkeit - der Hemmhof steigt mit der Konzentration des Antibiotikums -

c) von der Schichttiefe des Agars - ist bei gleicher Flüssigkeitsmenge und Wirkstoffkonzentration die Agarschicht dick, so bleibt der Hemmhof klein - ist sie dünn, so wird er groß -

d) von der Dichte der Einsaat - je dichter die Einsaat ist, um so schneller wird die Rasenbildung durch Bakterienkolonien erfolgen und um so kleiner werden die Hemmhöfe -

e) von der Vordiffusionszeit - mit Verlängerung der Diffusionsdauer vor Bebrütung der Platten nimmt der Hemmhofdurchmesser zu. Ohne Prädiffusion lassen sich unter günstigen Versuchsbedingungen (Substanz, Testkeim) allerdings schärfer begrenzte Hemmhöfe erzielen.

Weiterhin beeinflussen die Art des Testkeimes und die Zusammensetzung des Agars, besonders sein pH-Wert und sein Elektrolytgehalt, die Größe der Hemmhöfe. Als Testkeime können Bakteriensporen oder vegetative Keime benutzt werden. Wenn die antimikrobiellen Eigenschaften der zu untersuchenden Substanz es zulassen, werden Bakteriensporen bevorzugt, da sie problemloser zu verarbeiten sind. So läßt sich der mit Sporen beimpfte Agar auf maximal 70° C erhitzen und dann gleichmäßiger auf den Platten ausgießen als bei geringeren Temperaturen. Die weniger temperaturempfindlichen Sporen lassen sich auch ohne größeren zahlenmäßigen Verlust tieffrieren. Ein Teststamm aus vegetativen Keimen ist dagegen recht temperaturlabil und muß durch regelmäßiges Überimpfen gepflegt werden.

2.1.4.2 Arbeitsgang

Zum Ansetzen der Agartestplatten standen 100 ml Portionen eines 1,5% Difco Agars zur Verfügung. Die gleichbleibend abgefüllten Agarportionen wurden in der Nährbodenzentrale des Hygiene-Instituts der Freien Universität Berlin nach folgendem Rezept hergestellt:

Difco Agar	1,5%
Fleischextrakt	1,0%
Pepton	1,0%
Natrium Chlorid	0,3%
$Na_2HPO_4 \cdot 2\ H_2O$	2,0%
Glucose	1,0%
Spanagar	1,5%
Leitungswasser	91,7%.

Der pH-Wert des Agarmediums wurde auf 7,5 eingestellt. Nachdem der Agar im Dampftopf bei 100° C (60 Minuten) verflüssigt worden war, erfolgte die Abkühlung im Wasserbad auf 65° C (30 Minuten) mit Bacillus subtilis Sporensuspension (ATCC 6633 Dr. Kessler, Schering AG, Berlin) oder auf 48° C (60 Minuten) mit Streptococcus faecalis 27047 und E. coli 6311. Im Wasserbad wurde der Agar mit Keimsuspensionen beimpft. Dabei wurden 0,13 ml einer mit physiologischer Kochsalzlösung 1:10 verdünnten Keimsuspension von Streptococcus faecalis 27047 bzw. 0,3 ml einer 1:10 verdünnten E.coli-Suspension zu den Agarportionen gegeben. Mit Ausnahme der Bacillus subtilis Sporensuspensionen wurden alle Keimsuspensionen aus Übernachtkulturen hergestellt. Die Dichte der Beimpfung betrug pro ml Agar nach der Einsaat etwa 7500 Subtilissporen resp. 7500 Keime Streptococcus faecalis bzw. E.coli. Der Ansatz der Testplatten für die Kombination von Azlocillin plus Moxalactam erfolgte mit einem Zusatz von β-Lactamase Typ II von Bacillus cereus (Fa. Sigma, St. Louis USA, Lot. No. 87 C/03211). Dabei wurden 2,8 ml β-Lactamase zu 97,2 ml Flüssigagar im Wasserbad gegeben. Unter diesen Bedingungen ergibt sich ein Verhältnis von einer E. β-Lactamase auf 1 ml Agar. Bei den zu erwartenden Serumspitzenspiegeln von maximal 450 µg/ml bei Azlocillin in der Kombination mit Moxalactam reicht so eine Einheit Penicilinase dieses Typs bei einer Hydrolysierungskapazität von 1 µmol Bencylpenicillin pro Einheit aus, um 483,5 µg Azlocillin (Mol. Ge-

wicht 483,5) pro Minute bei 25° C und pH 7,0 zu inaktivieren.

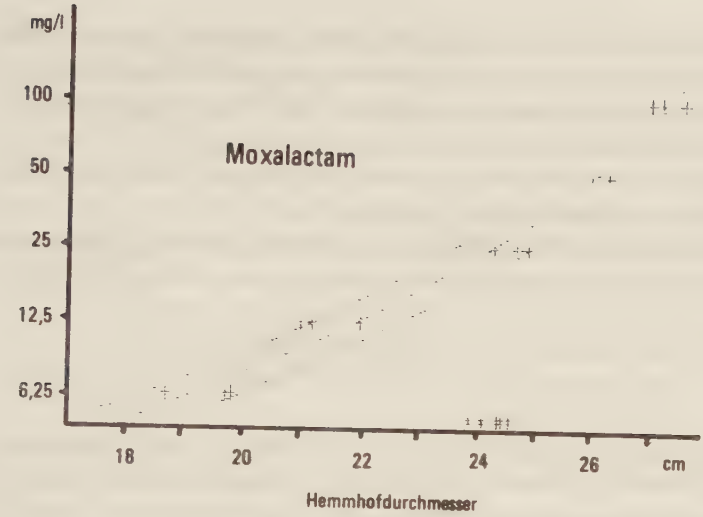
Die in den vorliegenden Untersuchungen benutzten Glasplatten sind quadratisch mit einer Kantenlänge von 25 cm und einem 2 cm hohen Rand aus Metall. Um eine genügende Anzahl von Proben auf einer Platte unterzubringen, ist eine Mindestgröße erforderlich. Die hier beschriebenen Testplatten bieten Platz für 30 Proben. Damit lassen sich pro Platte 5 Standard- und 5 Untersuchungsproben jeweils im dreifachen Ansatz unterbringen.
Die Platten wurden auf einer horizontalen Unterlage (Nivellierungstisch mit 3 Verstellschrauben und Libelle, Fa. Hübscher, Hamburg) mit dem Agar begossen. So ließ sich eine gleichmäßige Agarschichtdicke erreichen. Eine möglichst hohe Ausgießtemperatur und damit geringe Viskosität des Mediums diente ebenfalls einer homogenen Verteilung des Agars auf der Platte. Sie betrug für die mit Bacillus-Subtilis beimpften Agarchargen 65° C und für die Streptococcus faecalis und E. coli-Einsaat 48° C auf vorgewärmten und sterilisierten Platten. Eventuell aufgetretene Luftblasen in der Agarschicht ließen sich bei den mit Subtilisporen beimpften Platten durch rasches Abflammen mit dem Bunsenbrenner beseitigen. Die mit Streptococcus faecalis oder E. coli-Keimen beimpften Platten wurden nach dem Erkalten des Nährmediums (ca. 30 Minuten) für 10 Minuten mit UV-Licht bestrahlt, um das Oberflächenwachstum zu unterdrücken. Der Abstand zwischen Platte und UV-Lampe (22 Watt, Fa. B.A. Kohler AG, Steril-Air, Fälland en/Zürich) betrug 56 cm. Zur besseren Verfestigung des Agars wurden sämtliche Glasplatten für ca. 1 Stunde abschließend im Kühlschrank aufbewahrt.
Die Löcher wurden vorher mit einem abgeflammten Korkbohrer von 8 mm Durchmesser gestanzt. Die ausgestanzten Agarscheibchen ließen sich mit einem sterilen Skalpell entfernen. Dabei mußte beachtet werden, daß der Rand der Löcher nicht beschädigt wurde, und daß die angrenzende Agarschicht nicht abgehoben wurde. Sonst hätte ein Teil der eingefüllten Flüssigkeit zwischen Agarschicht und Glasplatte laufen können. Ein Hemmhof, der um solch ein Agarloch herum entstanden wäre, müßte unregelmäßig und damit nicht verwertbar sein.
Für das Einpipettieren der Lösung wurden Mikropipetten (Eppendorf 0,1 ml Mikropipetten, Netzler & Hinz, Hamburg) verwendet. Die Pipettenspitze wurde auf den Boden des ausgestanzten Agarlochs aufgesetzt und während des Ausdrückens hochgezogen, bis der Flüssigkeitsspiegel mit der Agarschicht genau in einer Ebene lag. Nach REEVES und BYWATER (160) lassen sich durch

Füllung der Löcher bis zum Rand (anstatt mit konstantem Volumen) leichte Unregelmäßigkeiten in der Agarschicht bis zu einem gewissen Grad ausgleichen. Das Einfüllen der Proben darf bei dieser Methode nicht tropfenweise geschehen, da z.B. 4 Tropfen unter Umständen noch nicht ausreichen und 5 Tropfen das ausgeschnittene Loch schon bis über den Rand füllen würden.

Die Verteilung der Untersuchungs- und Standardproben auf die 30 Löcher der Agarplatte erfolgte in Anlehnung an eine von REEVES und BYWATER (160) beschriebene Methode in codierter und randomisierter Form. Durch die Randomisierung wurde eine gleichsinnige Störung aller drei Ansätze durch Agarunregelmäßigkeiten weitgehend vermieden. Die verschlüsselte Beschickung verhindert Fehler, die sich durch unbewußte Beeinflussung des Untersuchers beim Ablesen der Hemmhöfe ergeben könnten. Die Hemmhöfe wurden konsequent der Reihe nach abgelesen, d.h. ohne Kenntnis, ob es sich um eine Untersuchungs- oder Standardprobe handelte. Erst nachdem das gesamte Ableseergebnis aufgezeichnet worden war, wurde der Code entschlüsselt. Nach der Beschickung der Platten wurden diese mit einem Metalldeckel bedeckt. Vor dem Bebrüten wurde eine Prädiffusionszeit von 30 Minuten eingehalten. Die Testplatten wurden anschließend in genau horizontal austrahierten Positionen bei 37° C für 18-24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden die wachstumsfreien Höfe, die um die Stanzlöcher herum entstanden waren, mit einem Spezialgerät("Leebrook Microbilogical Zone Reader", Scientific & electronic Eng.Co. Ltd., Winchester, Hampshire) in zwei Durchmessern abgelesen. Bei abweichenden Resultaten wurde der Mittelwert beider Messungen für die Konzentrationsberechnung zugrunde gelegt.

2.1.4.3 Auswertung

Die Konzentrationsbestimmung der Antibiotika im Agardiffusionslochtest erfolgte nach einem Programm zur parabolischen Regressionsanalyse mit invertierten Vertrauensgrenzen (21, 92, 205). Dazu wurde ein Tischcomputer der Fa. Commodore (Pat. No. 2001) benutzt. Die nach diesem Programm ausgedruckte Standardkurve zeigte für Moxalactam in dem Konzentrationsbereich 6,25 - 100 mg/l einen parabolischen Verlauf. Für Azlocillin ergab sich in diesem Bereich ein linearer Zusammenhang zwischen Hemmhofdurchmesser und Zehnerlogarithmus der Konzentration (Abb. 3). Besondere Beachtung gilt in diesem Zusammenhang der Zusammensetzung des Standards. Da es sich bei dieser Me-



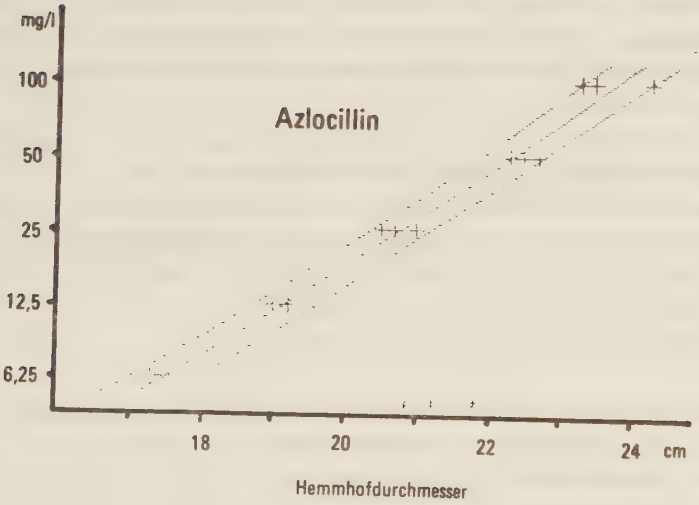


Abb. 3 Standardkurven mit 95,5% Vertrauensbereich
(Regressionsanalyse)

thode um einen Vergleich zwischen Untersuchungsmaterial und Standard handelt, müßten diese im absolut gleichen Milieu angesetzt werden. Eigentlich müßten deshalb die Serumkonzentrationen nur an einem Standard aus dem Leerserum desselben Probanden gemessen werden, was technisch in diesem Versuchsansatz nicht durchführbar erschien. Klinikpoolseren liefern hier ausreichend zufriedenstellende Ergebnisse (124).
Die Bestimmung der Antibiotikakonzentrationen im Urin erfolgte mit einer Angleichung des pH-Wertes sowie einer entsprechenden Vorverdünnung an den Standard (97).

2.1.4.4 Durchführung

Vor Beginn der Versuche war es nötig, die Methodik der pH-Stabilisierung des Moxalactams festzulegen. Um nicht jede einzelne Serumprobe individuell auf einen pH-Wert einstellen zu müssen, bei dem die chemische Stabilität der Substanz gewährleistet ist, erschien es sinnvoll, eine fixe Puffermenge pro Röhrchen vorzulegen, zu der ein festgelegtes Volumen an Probandenserum gemischt wurde. Individuelle Volumina würden später bei der Konzentrationsbestimmung über den Verdünnungseffekt nicht mehr nachvollziehbare Ergebnisse liefern.
Ziel der Vorversuche in diesem Zusammenhang war eine praktikable Standardisierung des Probandenserums auf einen pH bis maximal 7,1.
Es wurden im einzelnen die zeitlichen Phasen und Bedingungen des Versuchsablaufes simuliert und die pH-Verschiebungen mit und ohne Zusatz vom Puffer gemessen:

1. pH-Verschiebung von frischem humanem Serum

   a) nach 10 Minuten bei 3000 Umdrehungen pro Minute zentrifugieren
   b) nach 1 Stunde bei 4° C im Kühlschrank
   c) nach 2 Stunden bei 4° C im Kühlschrank

2. pH-Stabilität von inaktiviertem, frischem Human-pool Serum pH 8,6 (Klinikum Steglitz) nach Abpufferung mit 0,1 n HCl auf pH 6,5 und nachfolgender pH-Bestimmung über 1 Stunde bei Zimmertemperatur und 2 Stunden bei 4° C.

3. Bebrütung von unbehandeltem Human Serum pH 8,6 für 18 Stunden bei 37° C mit nachfolgender pH-Messung sowie Bebrütung von MHB/Suppl. pH 7,35 für 18 Stunden bei 37° C mit nachfolgender pH-Messung.

4. pH-Stabilisierung von frischem Human Serum (zentrifugieren 3000 Umdrehungen pro Min. 10 Minuten), abgepuffert 1:10 mit zehnfach konzentriertem Sörensen Phosphat Puffer pH 6,0. Darauf für 2 Stunden stehenlassen bei Zimmertemperatur sowie 18 Stunden bei 4° C.

5. pH-Stabilisierung einer wie oben beschriebenen Serumprobe und Einfrieren der Probe für 3 Tage bei minus 30° C.

Die Messungen zeigten eine ausreichende pH-Stabilität der supplimierten MÜLLER HINTON Bouillon während der 18-stündigen Bebrütung bei 35° C, sowie eine optimale Stabilisierung des pH-Wertes der Serumproben 1:10 mit zehnfach konzentriertem Phosphat-Puffer nach Sörensen pH 6,0 und Lagerung bei minus 30° C.
Desweiteren mußte das Problem der Substanzinaktivierung des Azlocillins in der Kombination mit Moxalactam über eine β-Lactamase geklärt werden. Dazu wurden Vorversuche mit 2,8 ml β-Lactamase Typ II pro 100 ml Agar angesetzt.
Das dabei bestehende Verhältnis von einer Einheit β-Lactamase pro ml Agar sollte hierbei auf seinen ausreichend selektiv inaktivierenden Effekt auf das Azlocillin untersucht werden. In keinem Fall ergab sich eine Beeinflussung des Bioassays von Moxalactam in Gegenwart von Azlocillin, so daß auf eine vollständige Substanzinaktivierung des Azlocillins geschlossen werden darf.

Für die Bestimmung von Azlocillin in Gegenwart von Moxalactam wurde ein Stamm Streptococcus faecalis 27047 verwendet, der in seinem Wachstum bei den zu erwartenden Konzentrationen von Moxalactam unbeeinflußt blieb.
Der Bereich der Standardkonzentrationen wurde nach den vorliegenden Serumkonzentrationen ausgewählt.

2.1.4.5 Analytische Zuverlässigkeit

Die untere Nachweisgrenze der hier untersuchten β-Lactam-Antibiotika wurde im frischen Poolserum und Puffer (1/15 molarer Phosphatpuffer nach SÖRENSEN pH 7,0) bestimmt. Für die Bestimmung wurde eine Verdünnungsreihe ausgehend von einer Konzentration

für Azlocillin in der Einzelapplikation von 6,25 mg/l
für Azlocillin in der kombinierten Applikation von 50 mg/l sowie
für Moxalactam in beiden Fällen von 12,5 mg/l

im Puffer angesetzt und die untere Nachweisgrenze dergestalt festgelegt, daß der Konzentrationsbereich zwischen gerade noch erkennbarer Hemmung des Keimwachstums und der nächstfolgenden nicht mehr hemmenden Konzentration als Endpunkt (Mittelwert) gilt.

Im einzelnen ergeben sich folgende untere Nachweisgrenzen:

Azlocillin	0,15 mg/l	Sarcina lutea / B.subtilis	
im Serum			
Azlocillin / Komb.	1,2 mg/l	Streptococcus faecalis	
Moxalactam	0,6 mg/l	E.coli 6311	
im Serum			
Moxalactam / Komb.	0,3-0,6 mg/l	E.coli 6311 + 2,8 ml II β-Lactamase	
Azlocillin	0,15 mg/l	E.coli 6311	
im Puffer			
Moxalactam	0,15 mg/l	B.subtilis.	

Die Variationskoeffizienten betrugen für Azlocillin 8,6 und für Moxalactam 13,6% über den gemessenen Konzentrationsbereich. Zur Herstellung der Standardlösungen wurden folgende Laborsubstanzen verwendet:

1. Azlocillin: Azlocillin - Natrium, Lot No.pt 1416 G
Gläser zu ca. 600 mg
Aktivitätstäter: 840 mg pro l
Fa. Bayer, Leverkusen

2. Moxalactam: Di - Natriumsalz Lot No. Ly 127935
Gläser zu 10 mg Diacetat äquivalent
Fa. Ely Lilly, Lahn-Gießen.

Die Konzentration der Standardreihen richtete sich nach den erwarteten Serumspiegeln der applizierten Substanzen.
Die Laborsubstanzen wurden im frischen, gepoolten, aktivitätsfreien Humanserum (Chemotherapeutisches Labor Klinikum Steglitz) gelöst.
Dabei wurden für die 3 Versuchsanordnungen Standardreihen verschiedener Ausgangskonzentrationen hergestellt.

1. für Azlocillin in der Einzelapplikation:

Versuchsphase			Standard
direkt nach der Infusion	bis 4 h	:	100/50/25/12,5/6,25
	bis 6 h	:	25/12,5/6,25/3,125/ 1,56
	bis 8 - 10 h	:	6,25/3,125/1,56/0,78/0,39.

Um die Konzentrationen von Standard und Probandenserum noch effektiver anzugleichen, wurde zusätzlich das Testserum den abfallenden Konzentrationen entsprechend den Zeitintervallen verdünnt und zwar für Azlocillin in der Einzelapplikation nach folgenden Maßstäben:

Versuchsphase			Probandenserumverdünnung
direkt nach Infusion -	bis 20 Min.	:	1:10
30' -	60'	:	1: 5
90' -	2 h	:	1: 2
ab 3 h -	10 h	:	unverdünnt.

Ebenso wurde für Moxalactam sowie für Azlocillin in Gegenwart von Moxalactam verfahren:

2. Moxalactam in der Einzelapplikation:

Versuchsphase		Standard
direkt nach der Infusion bis	6 h :	100/50/25/12,5/6,25
bis	8 h :	50/25/12,5/6,25/3,125
bis	10 h :	12,5/6,25/ 3,125/ 1,56/ 0,78

Testserumanpassung:

Versuchsphase		Verdünnung
direkt nach Infusion -	30' :	1:5
	45' :	1:3
	60' :	1:2
ab 90' -	10 h :	unverdünnt.

3. a) Azlocillin in kombinierter Applikation:

Versuchsphase		Standard
direkt nach Infusion -	2 h :	200/100/50/25/12,5
3 -	4 h :	100/50/25/12,5/6,25
	6 h :	25/12,5/6,25/3,125/1,56/
8 -	10 h :	12,5/6,25/3,125/1,56/0,78

Testserumanpassung:

Versuchsphase		Vorverdünnung
direkt nach Infusion -	5' :	1:5
	10' :	1:3
20' -	45' :	1:2
60' -	10 h :	unverdünnt.

3. b) Moxalactam in der Kombination

Versuchsphase		Standard
direkt nach Infusion - 6 h	:	100/50/25/12,5/6,25
8 h	:	50/25/12,5/6,25/3,125
10 h	:	12,5/6,25/3,125/1,56/0,78

Testserumanpassung:

Versuchsphase		Vorverdünnung
direkt nach Infusion - 5'	:	1:10
10'	:	1: 5
20' - 45'	:	1: 3
60' - 90'	:	1: 2
2 h - 10 h	:	unverdünnt.

Für die Bestimmung der Urinkonzentration wurde für Azlocillin mit Phosphatpuffer 1/15 molar pH 7,0 und für Moxalactam mit zweibasischem Kalium-Phosphatpuffer pH 6,0 der Standard angesetzt.

Für die drei Versuchsanordnungen wurden für die Ausscheidungsphasen wieder verschiedene Standards und Verdünnung gewählt:

Versuch A Azlocillin 5 g in der Einzelapplikation

Ausscheidungsphase		Standard
0 - 12 h	:	100/50/25/12,5/6,25
12 - 24 h	:	50/25/12,5/6,25/3,125

Urinvorverdünnung

Phase		Vorverdünnung
0 - 4 h	:	1:200
4 - 8 h	:	1: 10
8 - 24 h	:	unverdünnt

Versuch B Moxalactam 2 g in der Einzelapplikation

Ausscheidungsphase		Standard
0 - 12 h	:	100/50/25/12,5/6,25
12 - 24 h	:	50/25/12,5/6,25/3,125

Urinvorverdünnung

Phase		Vorverdünnung
0 - 4 h	:	1:100
4 - 8 h	:	1: 10
8 - 12 h	:	1: 2
12 - 24 h	:	unverdünnt

Versuch 3. a) : Azlocillin in Kombination mit Moxalactam

Ausscheidungsphase		Standard
0 - 12 h	:	200/100/50/25/12,5
12 - 24 h	:	100/50/25/12,5/6,25

Urinverdünnung: keine

Versuch 3. b) : Moxalactam in Kombination mit Azlocillin

Ausscheidungsphase		Standard
0 - 24 h	:	100/50/25/12,5/6,25

Urinverdünnung: keine

Die Vorverdünnung sämtlicher Urine erfolgte mit dem jeweiligen Puffer nach Maßgabe der in den Vorversuchen ermittelten Konzentrationen. Außerdem wurden zum Teil einzelne Urine gesondert vorverdünnt, sofern die ausgeschiedene Menge dies erforderte.
Die Bestimmung der Ausgangskonzentrationen (gelöste Substanz im Spritzenkolben vor der Infusion) erfolgte stichprobenartig. Die Standards wurden im jeweiligen Puffer angesetzt und die Testsubstanz ebenfalls mit Puffer wie folgt vorverdünnt.

Versuch 1.	:	Azlocillin i.d. Einzelapplikation
Versuch 3.	:	Azlocillin in der Kombination
Verdünnung	:	1:2000

Versuch 2.	:	Moxalactam i.d. Einzelapplikation
Versuch 3.	:	Moxalactam in der Kombination
Verdünnung	:	1:800

Pufferzubereitungen

Söhrensen Phosphatpuffer 1/15 molar pH 7,0 :

Lösung I: 9,078 g KH_2PO_4 auf 1000 ml Wasser
Lösung II: 11,876 g Na_2HPO_4 auf 1000 ml Wasser
dann mischen von 40 ml Lösung I mit 60 ml Lösung II.
Zweibasischer Kaliumphosphatpuffer 0,1 molar pH 6,0 :
2,0 g KH_2PO_4
\+ 8,0 g K_2HPO_4
auf 1000 ml Wasser.

Vor Versuchsbeginn wurden alle benutzten Seren, Urine und Verdünnungsmedien auf antibakterielle Aktivität geprüft.

2.1.5 Hochdruckflüssigkeits - Chromatographie (HPLC) Azlocillin.

Prinzip der Methode:

Serum wurde mit Acetonitril enteiweißt. Der eiweißfreie Überstand wurde mit Puffer vorverdünnt. Urin wurde ohne Enteiweißung vorverdünnt. Die so vorbereiteten Proben wurden an einer mit Oktadecyl-silanol beschichteten Kieselgelsäule (C 18) getrennt (reversed phase chromatographie).
Die Absorption des Säuleneluates wurde bei 220 nm fortlaufend registriert und diente zur Quantifizierung (die Methode wurde von Prof. Dr. K. Borner für die vorliegende Studie entwickelt).

Probenvorbereitung

Ein Volumen Serum oder wässriger Standard wurde mit einem Volumen Acetonitril gemischt. Nach Zentrifugieren des Gemisches wurde ein Teil des eiweißfreien Überstandes mit einem Volumenanteil Phosphatpuffer pH 6,45 gemischt und zur Chromatographie injiziert. Harn wurde je nach der Konzentration mit Puffer im Verhältnis 1+1 bis 1+19 vorverdünnt.

Chromatographische Bedingungen

Mobile Phase : Lösung A: Natrium-phophat-Puffer, pH 6,4 10 mmol/l
Lösung B: Acetonitril p.A.
fertiges Gemisch: 87% Vol. A + 13% Vol. B

Pumpe : Modell 1/2 (Perkin Elmer), Fließgeschwindigkeit 2 ml/Min.

Injektor : Schleifeninjektor Rheodyne 7125, Injektionsvolumen 15 Mikroliter.

Vorsäule : Perisorb RP 18,30 x 4 mm, Partikelgröße 30 - 40 µm (E. Merck, Darmstadt)

Säule : Lichrosorb RP 18,125 x 4mm, Partikelgröße 5 µm
(E. Merck, Darmstadt) Raumtemperatur.

Detector : Absorptionsphotometer LC 55
(Perkin Elmer) 220 nm

Integrator : Modell 3390 (Hewlett Packard)

Berechnung : Flächen, externer Standard

Retentionszeit : Azlocillin ca. 6 Minuten

Analytische Zuverlässigkeit:

Während der Entwicklung der Methode wurden folgende Kriterien der analytischen Zuverlässigkeit ermittelt.
Die untere Nachweisgrenze betrug ca. 0,5 mg/l Azlocillin im Serum.
Der lineare Meßbereich reichte bei empfindlichster Detektoreinstellung bis über 250 mg/l.

Die Präzision in Serie wurde mit einem humanen Mischserum bestimmt, dem jeweils 10, 50 oder 250 mg Azlocillin/l zugesetzt wurden. Die Variationskoeffizienten betrugen 5,8 , 2,5 und 2,2% über den gemessenen Konzentrationsbereich. Die mittlere Wiederfindung belief sich auf 111,2 , 99,4 und 93,6% der Einwaage.
Interferenzen mit endogenen oder exogenen Substanzen wurden nicht beobachtet. Die Identität von Azlocillin wurde zusätzlich durch Abbau mit Betalactamase bestätigt (Abb. 4).
Der Methodenvergleich von HPLC und mikrobiologischen Assay mit der bivalenten Regressionsanalyse (28) zeigte für Azlocillin im Urin allein keinen signifikanten Unterschied (Abb. 24). In Gegenwart von Moxalactam zeigte der Bioassay bei Konzentrationen von weniger als 100 mg Azlocillin/l geringfügig höhere Ergebnisse, die noch nicht als relevant anzusehen sind (Abb. 25). Der Methodenvergleich der Ergebnisse im Serum ergab in beiden Serien mit und ohne Moxalactam keinen signifizierten Unterschied (Abb. 22, 23).

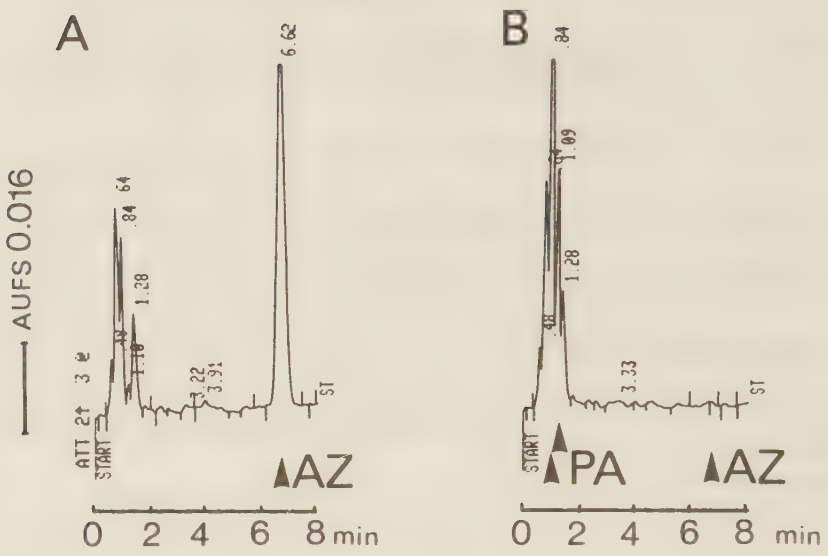


Abb. 4 Enzymatische Identifikation von AZLOCILLIN durch ß-Lactamase.

AZ : AZLOCILLIN
PA : Penicilloat des AZLOCILLINs

Chromatogramm A : Serum + 250 mg/l AZLOCILLIN
Chromatogramm B : nach Abbau von Probe A mit ß-Lactamase aus Bac. cerius (II)

Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie (HPLC) von Moxalactam

Prinzip der Methode:

Serum wurde mit Acetonitril enteiweißt. Urin wurde ohne Zusatz von Acetonitril mit Puffer pH 6,45 vorverdünnt.
Die so vorbereiteten Proben wurden an einer beschichteten Kieselgelsäule in Gegenwart des Ionenpaarbildners Tetrabutylamoniumphosphat getrennt (reversed phase ion pair chromatographie). Die beiden Isomeren von Moxalactam (R und S Form) wurden gemeinsam eluiert. Die UV-Absorption des Eluates wurde bei 254 nm fortlaufend registriert und diente zur Qualifizierung (die Methode wurde von Prof. Dr. K. Borner für die vorliegende Studie entwickelt).

Probenvorbereitung:

Ein Volumenanteil Serum oder wässriger Standard wurde mit zwei Anteilen Acetonitril versetzt. Nach Zentrifugieren des Gemisches wurde ein Teil des eiweißfreien Überstandes in den Chromatographen injiziert. Urin wurde mit Puffer pH 6,45 nach SÖRENSEN je nach Konzentration im Verhältnis 1:1 bis 1:19 vorverdünnt.

Chromatographische Bedingungen:

Mobile Phase: eine Flasche Tetrabutylamoniumphosphat (PIC A reagent, Fa. Waters Ass., Königstein) wurde mit Aqua dest. auf 1 l aufgefüllt (Konzentration 5 mmol/l) und mit ca. 100 Mikroliter konzentrierter Phosphorsäure auf pH 7 eingestellt. Für Serum wurden 82 Volumenanteile Puffer und 18 Volumenanteile Acetonitril gemischt, für Urin 84 Anteile Puffer mit 16 Anteilen Acetonitril.

Pumpe : Modell 2/l (Perkin Elmer) Fließgeschwindigkeit 2 ml/Minute.

Injektor : Autosampler LC 420 (Perkin Elmer), Injektionsvolumen 10 µl.

Säule : Microbondapak (Waters Ass.) 300 x 40 mm, Partikeldurchmesser 10 µm, Raumtemperatur.

Detector : Festwellenlängen-Detektor LC 15 (Perkin Elmer) 254 nm, Bereich 0,008 - 0,032.

Integrator : Modell SP 4000 (Spectra Physics)

Berechnung : Flächen, externer Standard.

Retentionszeit : Moxalactam 5 - 6 Minuten.

Analytische Zuverlässigkeit:

Während der Entwicklung der Methode wurden folgende Kriterien der analytischen Zuverlässigkeit bestimmt.
Die untere Nachweisgrenze betrug ca. 2,5 mg/l Serum. Der lineare Meßbereich reichte bei empfindlichster Detektoreinstellung bis $\geq$ 100 mg/l.
Die Präzision von Tag zu Tag wurde mit 2 Probanden-Serien bestimmt und betrug bei einer Konzentration von 101,1 mg/l 4,5% (N=6) und bei 78,4 mg/l 5,8% (N=14) ausgedrückt als Variationskoeffizient (VK).
In zwei Probandenserien wurde die Wiederfindung von 50 mg Moxalactam/l zu je 10 Leerseren bestimmt. Die Wiederfindung belief sich auf 98,5 $\pm$ 2,7% der Einwaage in der 1. Serie und 99,0 $\pm$ 6,0% in der 2. Serie.
Interferenzen wurden im Serum und im Urin nicht beobachtet. Moxalactam wird durch Betalactamase nicht abgebaut. Ein spezifischer Identitätsnachweis wie im Falle des Azlocillins war somit nicht möglich.
Der Methodenvergleich von HPLC und mikrobiologischem Assay mit der Bivarianten Regressionsanalyse zeigte für Urin eine sehr gute Übereinstimmung (Abb. 28, 29). Der Methodenvergleich mit Serum ergab in der 1. Serie (Moxalactam allein) im Bioassay ca. 16% höhere Werte (Abb. 26) und in der 2. Serie (Moxalactam und Azlocillin) praktisch identische Resultate (Abb. 27).

Methoden:

Statistik : Die statistische Auswertung erfolgte nach dem Wilcoxen-Test (172)
Der Methodenvergleich wurde mit der bivarianten Regressionsanalyse untersucht (28).

2.2 Serum Bakterizidie (SBA)

2.2.1 Allgemeine Vorbemerkungen:

Die Bestimmung der SBA erfolgte in Anlehnung an experimentell bereits erprobte Methoden (12, 51, 89, 125, 136, 201) im Titertek-Mikroverdünnungsverfahren.
Serum Bakterizidie-Meßpunkte waren für 1 h und 6 h nach Injektion von 2 g Moxalactam, 5 g Azlocillin und die Kombination aus beiden festgelegt worden. Die bakterizide Aktivität der Probandenseren wurde gegen 6 klinisch frisch isolierte Keime (Institut für Hygiene und Mikrobiologie, Freie Universität Berlin) gemessen.

2.2.2 Vorgehensweise:

Der Ansatz der Probandenseren erfolgte in der Mikrotitrationsverdünnungsreihe in den Stufen 1:2 bis 1:16. Als Verdünnungsmedium wurde eine mit Ca^{2+} und Mg^{2+} angereicherte Mueller Hinton Bouillon (Fa. Schering, Berlin) verwendet, die 1:1 mit gepooltem Humanserum gemischt wurde (17, 198). Nach Inokulation und Bebrütung erfolgte die Ablesung der minimalen Hemmkonzentration und die Überimpfung von Proben aus den einzelnen Titerstufen auf Blutagarplatten sowie erneute Bebrütung. Nach Auszählung der ausgewachsenen Bakterienkolonien pro Titerstufe läßt sich so unter Berücksichtigung der ursprünglich inokulierten Keimzahl sowie der verwendeten Volumina auf diesem Wege diejenige Titerstufe bestimmen, bei der 99,9% des Keimwachstums gehemmt werden.

2.2.2.1 Voruntersuchungen

Orientierende Vorversuche fanden statt bezüglich des Verdünnungsmediums, der Frage der Komplementinaktivierung sowie der Auswahl der Keime nach Feststellung der MHK-Werte und der tatsächlichen Inokulationskonzentration. Außerdem wurde die bakterizide Eigenaktivität der 10 Probandenseren gegen die ausgewählten Keime bestimmt.

Zum Medium:

Nach eingehendem Literaturstudium und vergleichenden Versuchsansätzen wurde die mit Ca^{2+} und Mg^{2+} angereicherte Mueller Hinton Bouillon 1:1 mit Human-Poolserum versetzt ausgewählt, da sie nach gegenwärtigem Erkenntnisstand für die uns hier interessierende Keimauswahl von Enterobacteriaceae und unter den angestrebten Versuchsbedingungen der Situation in vivo am ehesten angenähert ist (17, 18, 198).

Zusammenstellung der Mueller Hinton Bouillon:

997,6 ml destilliertes H_2O zu 21,0 g Mueller Hinton Bouillon Puder
+ 2,0 ml 10%iges $CaCl_2 \times 2\ H_2O$
+ 0,4 ml 50%iges $MgSO_4 \times 7\ H_2O$
pH Justierung mit 0,1 n NaOH bzw. 0,1 n HCl auf pH 7,3 - 7,4 bei 25° C

dazu im Verhältnis 1:1
frisches, gepooltes Humanserum, steril filtriert (Porengröße 200 µm Asbestfilter, Fa. Seitz EKS II) pH Justierung mit 0,1 n NaOH bzw. 0,1 n HCl auf pH 7,3 - 7,4 bei 25° C.

Zur Komplementaktivität:

Die verwendeten Poolseren (Med. Poliklinik, Klinikum Steglitz) wurden vor und nach Inaktivierung des Komplements im Wasserbad (30' bei 56° C) auf C_3 und C_4 Komplementaktivität untersucht.
Wegen der Temperaturempfindlichkeit des Moxalactams (213) war es nicht möglich, die Komplementaktivität des Probandenserums über 30' bei 56° C auszuschalten. Um im Versuchsansatz keinen Unterschied der Behandlung zwischen dem Probandenserum und dem verwendeten Human-Poolserum zu machen, wurde nicht inaktiviert.
Ausführliche Untersuchungen befaßten sich daher mit der Eigenaktivität des Probandenserums sowie des Poolserums.

So wurden Ansätze hergestellt von

a) frischem, aktivem Humanserum
b) inaktivem (30' bei 56° C) Humanserum
c) Mueller Hinton Bouillon/Ca^{++}, Mg^{++}Suppl./ 50% Humanserum
d) Mueller Hinton Bouillon/Ca^{++}, Mg^{++}Suppl.
e) filtriertem (200 µm Porengröße) Human-Serum

gegen:	E. coli	Proteus mirabilis
	Klebsiella oxytoka	Streptococcus faecalis
	Enterobacter sakazakii	Pseudomonas aeruginosa

um die bakterizide Eigenaktivität von frischem, aktivem Humanserum zu bestimmen.
Der Ansatz erfolgte in 4 Titerstufen (1. Reihe reines Humanserum, 2.-4. Reihe fortschreitend mit MHB/Suppl. verdünnt).

Inokulation:

Für die Keimeinsaat wurde von Übernachtkulturen der jeweiligen Stämme ausgegangen. Die so auf $1x10^9$ K/ml ausgewachsenen Kulturen wurden darauf in sterilen Reagenzgefäßen (Fa. Greiner, Nürtingen, verschließbare Röhrchen, Kunststoff ppn 17/100) in MHB/Suppl. auf $1x10^6$ K/ml verdünnt. Dabei wurden für die Übernachtkulturen 5 ml MBH/Suppl. pro Keim mit der Platinöse aus klinischen, frischen Keimisolaten beimpft und 18 h bei 35° C bebrütet. In einer Reihenverdünnung, ausgehend von 1 ml der Übernachtkultur wurde nun in der Nährbouillon in drei Stufen 1:10 bis zu einer Keimdichte von $1x10^6$ K/ml herunterverdünnt.

Beispiel:	1 ml Übern. Kultur vermischt mit	
	9 ml MHB/Suppl.	
daraus	1 ml erneut in	
	9 ml MHB/Suppl. und vermischt.	
daraus	1 ml erneut in	
	9 ml MHB/Suppl. und vermischt.	
=	1×10^6 K/ml.	

Zur Überprüfung der Methode wurde eine Keimzahlbestimmung der erhaltenen Verdünnung mit dem Membranfilterverfahren durchgeführt. Dabei bedient man sich folgender Methode (107):
Es werden von der zu prüfenden Suspension Verdünnungsschritte in Zehnerpotenzen angelegt, wobei schließlich jedes Röhrchen 9 ml der entsprechenden Verdünnung enthält. Jede Verdünnungsstufe wird durch einen bakteriendichten Membranfilter (Sartorius, Göttingen, 45µm Porengröße) mit der Wasserstrahl-Unterdruckpumpe gesaugt. Anschließend werden 20 - 50 ml Kochsalzlösung (steril) durch den Filter geschickt, um den Filter zu spülen. Das Filterblatt wird anschließend abgenommen und mit derjenigen Fläche, welche im Filtergerät der stützenden Glasfritte aufliegt, auf eine Agarplatte gelegt, wobei Falten und Luftblasen zu vermeiden sind. Die zurückgehaltenen Bakterien liegen auf der der Luft zugekehrten Seite des Filterblattes und sind somit vom Agar durch die poröse Folie getrennt.
Diese imbibiert sich in kürzester Zeit mit der flüssigen Phase des Agars und die zurückgehaltenen Keime wachsen zu Kolonien aus. Diese sind als Erhabenheiten leicht zu erkennen. Die ausgezählten Kolonien dividiert man durch 9 (auf 1 ml bezogen) und multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor der verarbeiteten Suspensionen.
Es resultiert die Keimzahl pro ml der verarbeiteten unverdünnten Ausgangssuspension.

Keimauswahl:

Zur Auswahl der für die Bakterizidiebestimmungen geeigneten Keimspezies wurden an verschiedenen Tagen insgesamt 15 Keime auf ihre Empfindlichkeit gegen Azlocillin und Moxalactam getestet. Darunter 12 klinisch frisch isolierte Stämme (2 Pseudomonas aeruginosa, 2 Klebsiella oxytoca, 2 Proteus mirabilis, 2 Enterobacter sakazakii, 2 E. coli, 2 Streptococcus faecalis) sowie 3 Referezkeime:

für Azlocillin : 1) Pseudomonas aeruginosa 7265, MIC: 4,0 mg/l
2) Enterobacter 5075, MIC: 8,0 mg/l
Fa. Bayer, Leverkusen

für Moxalactam : Providencia stuartii No. 63, MIC: 0,1 mg/l
Fa. Ely Lilly & Co., Gießen/Lahn.

Die MIC Bestimmungen wurden wie alle anderen Untersuchungen dieser Art im Titertek Mikrodilutorsystem mit Suppl. Mueller Hinton Bouillon, jedoch ohne Humanserum im Ansatz durchgeführt. Außerdem wurde für alle Keime der MBC-Wert bestimmt.
Ausgewählt wurden schließlich diejenigen Keimspezies, deren MIC-Werte innerhalb der zu erwartenden Serumkonzentrationen der applizierten Präparate lagen.
Die Tabelle 21 zeigt die Ergebnisse dieser Voruntersuchungen.

Materialien:

Letzte vorbereitende Untersuchungen bezogen sich auf das zu verwendende Instrumentarium für die Bakterizidiebestimmung im Reihenverdünnungsverfahren. Mit Hilfe der automatisch angetriebenen 12fach Dilutorköpfe und der dazugehörigen Lochvertiefungsplatte (Flow Laboratories GmbH. Titertek Multidilutor No. 77-101-00, Dilutorköpfe No. 76-755-99, Lochvertiefungsplatte U-förmig Limbro JS-MVC-96) lassen sich im Mikroverfahren sehr rationell Verdünnungsreihen herstellen:
Die Dilutorköpfe entnehmen aus vorgelegten Lochvertiefungen ein exaktes Volumen und vermischen es in der nächsten Reihe. Um Ungenauigkeiten der Dilutorköpfe zu vermeiden, die die Ergebnisse bei den verwendeten Volumina (0,1 ml Inhalt/Lochvertiefung) außerordentlich stark beeinflussen könnten, wurde eine Genauigkeitsmessung der aufgesogenen Volumina vorgenommen. Es wurde mit Humanserum jeder einzelne Dilutorkopf vor und nach Vollsaugen auf einer Analysen-Feinwaage (Sartorius, Typ 2662) ausgewogen. Dabei zeigte sich voll befriedigende Genauigkeit. (Reines Wasser konnte wegen der zu hohen Oberflächenspannung und der dadurch unvollständigen Benetzung nicht für Meßzwecke verwendet werden).
Des weiteren mußte die Zwölfkanalpipette (Flow Lab. Ser. No 11078) mit der sämtliche Volumina aufgetragen wurden, auf exakt 0,05 ml eingestellt und überprüft werden. Das erfolgte ebenfalls auf der Analysenfeinwaage mit dest. Wasser.
Der Fehler lag dabei um 5%.

2.2.3 Durchführung der SBA

Die für die Untersuchung nötigen ein- und sechs-Stunden Probandenseren wurden während der Versuche A, B und C zusammen mit den Proben für den Bioassay entnommen. Die Entnahme erfolgte über einen bereits in einer oberflächlichen Armvene liegenden Kurzkatheter und betrug pro Proband für jeden Meßpunkt 10 ml Vollblut. Alle Proben wurden sofort in sterile, verschließbare Plastikreagenzgefäße gefüllt. Nach kurzer Aufbewahrungszeit bei 4° C wurden die Röhrchen geschlossen 10' bei 5000 U/min. zentrifugiert. Nur zum Abpipettieren des Serums in eine vorher markierte Röhrchenreihe wurde der Verschluß für kurze Zeit entfernt, um pH Verschiebungen in saure Bereiche durch Aufnahme von CO_2 zu verhindern. Die Seren wurden für die Bakterizidie-Untersuchungen nicht abgepuffert, da sie am Versuchstag selbst unmittelbar nach der Entnahme verarbeitet wurden. Vor der Serumprobenentnahme wurden die Mikrotiterplatten und die Plastikwannen (12fach geteilt, MA 4 8, Flow Laboratories) als Vorratsgefäße für das Verdünnungsmedium und die Keimsuspension vorbereitet. Alle Arbeiten fanden unter möglichst kontaminationsfreien Bedingungen statt, d.h., daß die Tischplatte gereinigt und danach mit einer Alufolie abgedeckt wurde, die vorher über dem Bunsenbrenner abgeflammt wurde. Die Aufteilung der Titerteklochvertiefungsplatten sowie der Plastikwannen war wie folgt:

für die 1 h Bakterizidie:

Gegen einen Keim wurde eine Styropyren-Lochvertiefungsplatte mit 96 Vertiefungen angesetzt, auf der bei Titerstufen zwischen 1:2 bis 1:16 acht Probandenseren getestet wurden. Der Ansatz war jeweils pro Keim und Proband 3fach, um zufällige Meßfehler und andere Unwägbarkeiten (Fremdinokulation durch Überspritzen etc.) auszuschalten.
Pro Platte wurde vorgelegt: MHB/Suppl. + 50% Humanserum ab Titerstufe 1:4 - 1:16. Die Bouillon wurde zu diesem Zweck in Plastikwannen (12 Rinnen, Fassungsvermögen 1 ml/Rinne) bereitgestellt und mit der Zwölfkanalpipette 0,05 ml pro Loch in die Reihen eingefüllt. Dabei mußte darauf geachtet werden, daß alle Pipettenspitzen gleichmäßig unter dem Flüssigkeitsspiegel ansaugen, um Luftansaugen zu verhindern.
Dann folgte das Überpipettieren von Probandenseren.

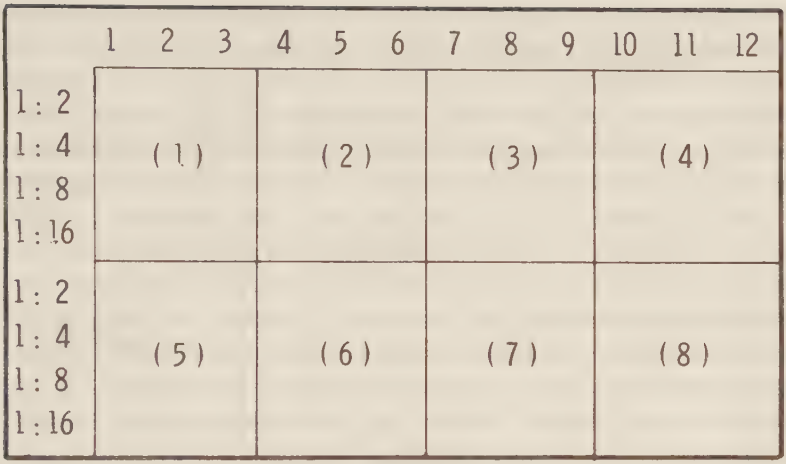


Abb. 5 Aufteilung einer Titertek-Reihenverdünnungsplatte im 3-fach Ansatz gegen 8 Probandenseren, für einen Keim.

Zuerst aus den verschiedenen Plastikreagenzröhrchen in die Plastikwannen, in denen jeweils 3 Rinnen für 1 Probandenserum vorgesehen waren und darauf mit der auf 3 Pipettenspitzen reduzierten Zwölfkanalpipette in die Lochvertiefungsplatten. Hierbei wurde nur in die 1:2 und 1:4 Titerstufen 0,05 ml eingefüllt.

Im Anschluß daran wurde die Platte unter den automatischen Mikro-Reihenverdünner gelegt und die Dilutorköpfe in die zweite Reihe der Verdünnungsstufen (1:4) eingetaucht. Dabei ist darauf zu achten, daß die Dilutorköpfe den Rand der Löcher möglichst nicht berühren (Kontamination!). Durch dreimalige Betätigung des Auslösers und entsprechende Drehbewegungen der Dilutorköpfe saugten diese nun 0,05 ml Flüssigkeit aus der zweiten Reihe an und vermischten sie mit der nächsten Reihe. Hier wiederholte sich der Vorgang und bis Reihe 1:16 wurden so 0,05 ml aus der jeweils vorherigen Reihe übertragen (siehe Abb. 6). Nach Entnahme der Dilutorköpfe aus der letzten Reihe wurden diese auf Löschpapier getrocknet und über dem Bunsenbrenner unter schwenkenden Bewegungen sterilisiert. Die Dilutorköpfe durften dabei nicht glühen, weil sich sonst durch Verformungen die aufgesogenen Volumina verändern könnten. Die Platten enthielten so nach abgeschlossener Verdünnung pro Loch 0,05 ml MHB/Suppl. + 50% Humanserum mit Probandenserum als Gemisch in absteigendem Verhältnis. Zuletzt wurde aus präparierten Plastikwannen die Keimsuspension ($1x10^6$ K/ml) zu allen Lochvertiefungen à0,05 ml gegeben.

Endgültig wurde so die fertig beschickte Platte mit 0,1 ml/Loch mit einer abgeflammten Alufolienabdeckung als Kontaminations- und Verdunstungsschutz 18 Stunden bei 35° C bebrütet. Die Platten 1 bis 6 für den Bakterizidiezeitpunkt 1 Stunde (für die 6 verschiedenen Keimspezies) wurden mit den Probandenseren Nr. 1 bis 8 angesetzt. Aus Aufteilungs- und Rationalisierungsgründen wurden die Probandenseren 9 und 10 pro Platte gegen alle 6 Keime aufgetragen. Die Beschickung der einzelnen Keim- und Probandenfelder war die gleiche wie vorher beschrieben, nur mußten verschiedene Keime auf engem Raum im Dreifachansatz überimpft werden, was besonders sorgfältiges Arbeiten voraussetzte.

Eine mögliche Fehlerquelle ergab sich aus der Einfülltechnik beimAuftragen der Keime. Der Pipettenknauf mußte möglichst langsam vollständig heruntergedrückt werden, um so Spritzer in die umgebenden Löcher zu vermeiden. Außerdem sollten die Pipettenspitzen beim Ausdrücken innen an der Lochwand aufliegen um evtl. Spritzer unter dem Lochrandniveau zu halten.

1) Reihe	0.05 ml	Probandenserum (unverdünnt)
	+ 0.05 ml	Keimsuspension ($5 \cdot 10^5$ K/ml)
	0.1 ml	Verdünnung 1 : 2
2) Reihe	0.05 ml	Probandenserum (unverdünnt)
	+ 0.05 ml	MHB / Suppl. / 50 % Humanserum
	0.1 ml	(1 : 2)
	− 0.05 ml	Dilutorentnahme
	0.05 ml	(1 : 2)
	+ 0.05 ml	Keimsuspension ($5 \cdot 10^5$ K/ml)
	0.1 ml	(1 : 4)
3) Reihe	0.05 ml	MHB / Suppl. / 50 % Humanserum
	+ 0.05 ml	Dilutor (1 : 2)
	0.1 ml	(1 : 4)
	− 0.05 ml	Dilutorentnahme
	0.05 ml	(1 : 4)
	+ 0.05 ml	Keimsuspension ($5 \cdot 10^5$ K/ml)
	0.1 ml	(1 : 8)
4) Reihe	0.05 ml	MHB / Suppl. / 50 % Humanserum
	+ 0.05 ml	Dilutor (1 : 4)
	0.1 ml	(1 : 8)
	− 0.05 ml	Dilutorentnahme - verwerfen
	0.05 ml	(1 : 8)
	+ 0.05 ml	Keimsuspension ($5 \cdot 10^5$ K/ml)
	0.1 ml	(1 : 16)

Abb. 6 Reihenverdünnung im Titertek - Mikroverfahren.

Desweiteren sollte die Pipette in einiger Entfernung zu den Keimwannen durchgedrückt und so zum Aufsaugen vorbereitet werden, um Spritzer in die umgebenden Rinnen mit anderen Keimsuspensionen zu verhindern.
Die freibleibenden Lochvertiefungen der Platten 9 - 10 wurden zum Ansatz von Wachstumskontrollen verwendet. Nach Abschluß der Bebrütung wurden die Titertekplatten bei Tageslicht über dem Schwenkspiegel (Titertek, Flow-Laboratories No. 77-440-00) abgelesen. Als minimale Hemmkonzentration wurde die Titerstufe bestimmt, bei der kein sichtbares Wachstum (Trübung, Verfärbung, Bodensatz) mehr nachzuweisen war. Pro Probandenserum und Keim wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt, um zufällige Fehler zu vermeiden. Bei unterschiedlichen Ergebnissen der 3er Reihe wurde wie folgt verfahren:

1. Wich eine Reihe von den ansonsten gleichen anderen beiden Reihen ab, so wurde die Titerstufe der beiden übereinstimmenden eingesetzt.

2. Bei Abweichungen aller drei Verdünnungsreihen wurde entweder der Mittelwert bestimmt, sofern er mit den ermittelten Werten der anderen Probandenseren für denselben Keim und die gleiche Abnahmezeit übereinstimmte, oder

3. wenn ein Vergleich nicht möglich war, wurde dieser Wert für die MHK-Bestimmung nicht mit einbezogen.

Für die Ermittlung der 24 h Bakterizidiewerte wurden anschließend für alle Keime und beide Bakterizidie-Zeitpunkte die Titerstufen 1:2 bis 1:16 auf Schafblutagarplatten 9 cm ø (Fa. Oxoid Rpp. 008 b physiolog.) überimpft.

Dabei wurde folgendermaßen vorgegangen:

Aus jeder der vier Kuppen der Verdünnungsreihe wurde 0,01 ml mit der Pipette (Eppendorf Ser. Nr. 3130) entnommen und quer in einem Strich über die gesamte Breite der Blutagarplatte an vier Punkten untereinander ein Flüssigkeitstropfen aufgetragen. Beim Eintauchen der Pipettenspitze unter den Flüssigkeitsspiegel der einzelnen Kuppen mußte die Flüssigkeit vor dem Ansaugen soweit aufgerührt werden, daß evtl. auf dem Kuppenboden abgesetzte Keimniederschläge wieder gut vermischt wurden.

Ein Ansaugen von der Oberfläche wie auch vom Zentrum des U-förmigen Bodens würde so keine verwertbaren Ergebnisse liefern. Der so aufgesetzte Tropfen wurde sofort mit der Platinöse vorsichtig, um keine Schäden oder Risse in die Agaroberfläche zu setzen, zu beiden Seiten verstrichen (Abb. 7). Die einzelnen Titerstufen durften dabei nicht zu nahe ausgestrichen werden um ein Konfluieren zu verhindern, wodurch später Fehlinterpretationen der Koloniezahl das Ergebnis verfälschen könnten. Die Markierung der Blutagarplatten in Richtung des Titerverlaufs sowie von Keim, Proband und Bakterizidiezeitpunkt, wurde vorher auf der Rückseite aufgetragen. Danach wurde erneut 18 Stunden bei 35° C bebrütet. Tags darauf wurde auf sämtlichen Blutagarplatten das Keimwachstum ausgezählt und in Tabellen registriert.

2.2.4 Auswertung

Erläuterung der SBA-Bestimmung

Die als Serum-Bakterizidie bezeichnete Wachstumshemmung wurde vereinbart als 99,9%ige Hemmung der inokulierten Keimzahl.
Durch Festlegung der vorgelegten Keimdichte (Keimzahl-Bestimmung s.o.) und die Verdünnungsverhältnisse innerhalb der Serumverdünnungsreihe (0,05 ml MHB/Suppl. + 50% Hum.-Serum zu 0,05 ml 1 x 10^6 K/ml in MHB/Suppl.) läßt sich nach folgender Rechnung die Keimkoloniezahl ermitteln bei der 99,9% des Wachstums gehemmt wurden:
Die zweite Kuppe der Verdünnungsreihe enthält nach der Entnahme von 0,05 ml Flüssigkeit durch die Dilutorköpfe 0,05 ml Flüssigkeitsgemisch aus 50% Probanden-Humanserum und 50% MHB/Suppl. + 50% Humanserum. Dazu wird 0,05 ml Keimsuspension (1x10^6 K/ml gegeben, d.h. Verdünnung der Keimdichte auf 5 x 10^5 K/ml. In den Titerstufen 1:8 bis 1:16 liegt die gleiche Verdünnung der Suspension vor. Postuliert man eine Überlebensrate von 0,1%, so bedeutet dies, ausgehend von 5 x 10^5 K/ml eine Reduktion um den Faktor 1000

$$\frac{5 \times 10^5 \text{ K/ml}}{1000} = 500 \text{ K/ml}.$$

Zum Zweck der Serumbakterizidiebestimmung entnehmen wir jedoch nur 0,01 ml/Ausstrich: Diese enthalten dann noch 5 K/0,01 ml.
Bis zu einer Koloniezahl von 5 pro Titerstufenausstrich können wir also

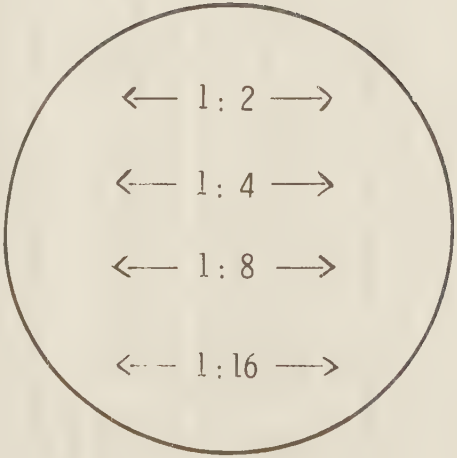


Abb.7 Auftragung der Verdünnungsstufen zur Koloniezählung auf eine Blutagarplatte.

von bakterizider bzw. von 99,9%iger Hemmung sprechen.
Um den Begriff der Bakterizidie nicht zu eng zu fassen und im Hinblick auf andere angewandte Methoden (12, 154), brachten wir zusätzlich den Begriff der 99%igen Hemmung entsprechend einer Koloniezahl von bis zu 50 in unsere Auswertung ein. Die Auftragung der Ergebnisse im Serum-Bakterizidie-Test folgte entsprechend der Reihenverdünnung einem exponentiellen Kurvenverlauf (in unserer Versuchsreihe 1:2 bis 1:16). Die Mittelwerte wurden deshalb nach Logarithmierung der Einzelergebnisse (ln x) bestimmt.

Bestimmung der bakteriziden Eigenaktivität der 10 Probandenseren:

Die für diesen Vorversuch benutzten 10 Probandenseren wurden vor Beginn aller Versuche aus Nüchtern-Vollblut gewonnen. Nach Zentrifugieren und Ab-pipettieren wurden die Seren gegen die 6 ausgewählten Keimspezies im Titertek-Mikroverdünnungsverfahren im 3-fach-Ansatz aufgetragen.
Die verwendeten Titertek Lochvertiefungsplatten wurden in der 1. Reihe des Ansatzes nur mit 0,05 ml Probandenserum (unverdünnt) beladen. Ab Reihe 2 bis 4 wurden 0,05 ml MHB/Suppl. + 50% Human Serum vorgelegt. Auf die 2. Reihe wurde ebenfalls 0,05 ml Probandenserum gegeben und danach beginnend ab dieser Reihe mit automatischem Dilutorsystem (Multidilutor No. 77-101-00 Flow Lab.) 0,05 ml Entnahmen aus den vorherigen in die nachfolgenden Reihen übertragen. Darauf wurden alle Reihen mit 0,05 ml $1 \cdot 10^6$ Keime/ml enthaltender Suspensionen überschichtet.
Die Titrationsreihe läßt so Bestimmungen der Titerstufen 1:2 bis 1:16 zu. Die Bestimmung der Bakterizidie erfolgte nach dem oben beschriebenen Verfahren quantitativ auf Schafblutagarplatten nach Überimpfung.

2.3 Pharmakokinetisches Modell und Berechnungen

Als Pharmakokinetik bezeichnen wir das Teilgebiet der Pharmakologie, welches sich mit der zeitlichen Änderung der Konzentrationen eines Pharmakons im Organismus befaßt. Nach DOST 1958 (43) wurde dieser Begriff auch als quantitative Auseinandersetzung zwischen Organismus und einverleibtem Pharmakon verstanden; hier wird die Wechselbeziehung zwischen dem Körper und der applizierten Substanz hervorgehoben. Damit werden die Einwirkungen beschrieben, die das Arzneimittel bzw. das Pharmakon von Seiten des

Körpers erfährt, insbesondere sind hier Resorption, Ver- oder Umverteilung, Metabolisierung, Speicherung und Elimination zu nennen (72, 76, 140, 162).

Nach der Applikation einer Substanz folgen je nach Applikationsweg die unten beschriebenen Teilschritte, die den Serumkonzentrationsverlauf dieses Pharmakons je nach dessen Spezifität und Affinität zu bestimmten Rezeptoren bzw. Verteilungsräumen beeinflussen (74). Bei der in diesen Versuchen gewählten intravenösen Infusionen der Antibiotika entfallen die Schritte der Absorption, der Distribution sowie der Diffusion im Lösungsmittel selbst und durch die Gewebs- bzw. Gefäßmembranen. Die Pharmakokinetik läßt sich so von der Infusion bis zur Elimation in folgende Einzelschritte aufgliedern (43, 72):

1. Transport durch das Blut
2.a) Diffusion zu den für die pharmakologische Wirkung verantwortlichen Rezeptoren.
   b) Gleichzeitig Diffusion in Flüssigkeitsräume, die dem Stoff auf Grund seiner physikalisch-chemischen Eigenschaften zugänglich sind. Diese Räume stellen neben dem Blut die wesentlichen Anteile des kinetisch faßbaren Verteilungsvolumens dar. Die Größe des Distributionsraumes ist insbesondere vom Grad der Eiweißbindung und der Molekülgröße sowie der Lipidlöslichkeit der Substanz abhängig.
3. Bindung an Proteine
4. Elimination
4.a) Biotransformation / Metabolisierung
4.b) Renale Exkretion, durch tubuläre Sekretion oder glomeruläre Filtration, wobei bei Antibiotika mit starker Eiweißbindung nur der freie Anteil glomerulär filtriert wird.

In dieser Arbeit wurde für das pharmakokinetische Verhalten der verwendeten Antibiotika ein sogenanntes offenes Zweikompartmentmodell zur Berechnung der pharmakokinetischen Parameter verwendet. Dieses ergibt den rechnerischen Hintergrund für die Konzentrationsverläufe der Substanzen, die sich nach intravenöser Injektion vom Blut (Zentrales Kompartiment) in ein parallel geschaltetes peripheres Kompartiment (Gewebe, Muskulatur etc.) verteilen (109, siehe Abb. 8).

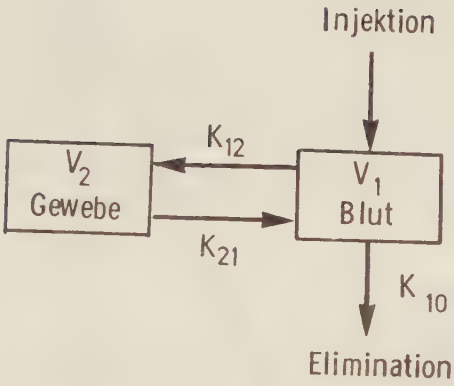


Abb. 8 Zweikompartmentmodell für intravasale Applikation (nach Fort, W, Henschler, D., Rummel, W., Pharmakologie u. Toxikologie, II Aufl., Wissenschaftsverlag Wien / Zürich, '77)

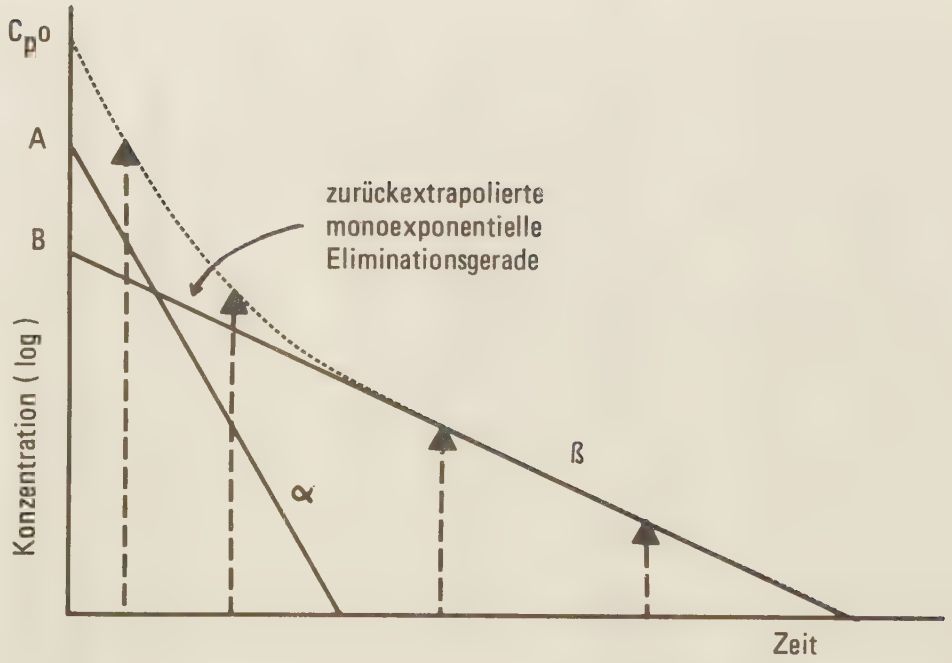


Abb. 9 Theoretischer Konzentrationsverlauf bei offenem Zwei-Kompartment Modell -Eingetragen die Steigungsgeraden der Funktionen Umverteilung (α) und der Funktion Elimination (ß)

Die in der Abb. 9 dargestellte Kurve entspricht in unserer Versuchsanordnung dem prinzipiellen Verlauf der Serumkonzentration. Da die Serumspiegel erst bei Abschluß der Infusion gemessen werden, erhalten wir eine reine Eliminationskurve.
Nach RITSCHEL (162) wird diese Funktion mit

$$Cp(t) = A \cdot e^{-\alpha \cdot t} + B \cdot e^{-\beta \cdot t}$$

beschrieben; wobei Cp (t) die Serumkonzentration in mg/l zur Zeit t in Min. ist. Als Hybridkonstanten bezeichnete er A, B, α, β zur Berechnung der pharmakokinetischen Sekundärkonstanten.
Nach dieser Gleichung entwickelten KOEPPE und HOEFFLER (112) ein EDV-Programm in Fortransprache auf einem Digitalrechner (IBM 1800). Nach diesem Programm (LØ II für intravenöse Applikationen) lautet die Formel nach Umsetzung auf 4 Parameter:

$$Y(t) = P1 \cdot e^{-P2 \cdot t} + P3 \cdot e^{-P4 \cdot t}$$

P_2 entspricht α, als Konstante für die Phase der schnellen Verteilung und P_4 entspricht β, als Konstante der Elimination. P_1 und P_3 bezeichnen die Punkte A und B (Abb. 9).
Entsprechend der Methode von Loo und Riegelmann (216) sind bei der Berechnung der pharmakokinetischen Daten die Infusionszeiten zu berücksichtigen. Sie gehen in dem Programm LØ II über den Zeitfaktor in die Funktion ein. Das Computerprogramm arbeitet als Regressionsanalyse nach einer Evolutionsstrategie, um stärker vom Regressionsmodell abweichende Einzelwerte noch einbeziehen zu können (111). Um mit dem jeweiligen Programm günstige Startwerte zur Eingrenzung der Parameterbereiche (P_1 bis P_4) einzugeben, wurden vorher die Hybridkonstanten (A, B, α, β und Cp 0) nach einer von RITSCHEL (162) beschriebenen Methode berechnet. Diese Bestimmung erfolgte nach der sogenannten Abschäl- oder Residualmethode über eine zeichnerische Darstellund der Serumkonzentrationskurven im halblogarithmischen Maßstab. Zur Verbesserung dieser Startwerte und zur Minimierung der Fehlerquadratsummen wurden selbstoptimierende Algorithmen einprogrammiert. Ausgehend von den Startwerten der Parameter wählte der einfache Algorithmus mit Hilfe eines Zufallsgenerators unabhängig sowohl Parameter als auch Schrittweite der Variationsrichtung (112). Mit den neuen Parametern wurde der Funktionsver-

lauf berechnet und mit den Meßpunkten, die vorher auf Lochkarten eingegeben wurden, verglichen. Falls sich ein im Vergleich zum Vorversuch günstigeres Ergebnis zeigte, was über die geringere Fehlerquadratsumme abgeschätzt wurde, wurde der neue Parameter als Eingangswert benutzt. Mit dem Zeilenausdruck wurde erst nach dem 100. Versuch begonnen. Die letzte Zeile wurde erst nach weiteren 10.000 Versuchen gedruckt.
Das Programm LØ II erwartete, daß sich die eingegebenen Konzentrationen auf mg pro Liter bezögen und auf ein konstantes Vergleichsgewicht von 70 kg berechnen würden. Aus diesem Grunde wurden vor der pharmakokinetischen Berechnung sämtliche erhaltenen Serumkonzentrationen auf ein mittleres Körpergewicht von 70 kg umgerechnet bzw. normalisiert.
Nach der beschriebenen Regressionsanalyse wurden so die pharmakokinetischen Parameter über die Control-Data Cyber 172 der zentralen Datenverarbeitung der Freien Universität Berlin bestimmt. Im einzelnen wurden dabei berechnet:

Cp0	Konzentration der Substanz zum Zeitpunkt t 0
$t_{1/2}\alpha$	Eliminationshalbwertszeit in der Verteilungsphase in Min.
$t_{1/2}\beta$	Eliminationshalbwertszeit für die β-Phase der Elimination in Min.
K_{10}	Eliminationskonstante bei intravasaler Applikation in Min.$^{-1}$
K_{12}	Verteilungskonstante für den Transfer vom zentralen zum peripheren Kompartiment in Min.$^{-1}$
K_{21}	Verteilungskonstante vom peripheren zum zentralen Kompartiment in Min.$^{-1}$
AUC	- Area under curve - Fläche unter der Serumspiegelkurve als Dosisumsatz pro Zeiteinheit in h · mg/l

$$AUC_{tot.}^{0-\infty} = \frac{B}{\beta} + \frac{A}{\alpha} \quad (h \cdot mg/l)$$

Vc entspricht dem Volumen im zentralen Kompartiment in l

Vdss Verteilungsvolumen der Substanz im steady state bei intravenöser Applikation in l / 100 kg

$$Vdss = \frac{k\,12 \cdot k\,21}{k\,21} \cdot V\,c \;(\,l\,/\,100\,kg\,)$$

Vdarea Verteilungsvolumen der Substanz in der β-Phase der Elimination bei intravenöser Applikation in l / 100 kg

$$Vdarea = Vdss + \frac{k\,12 - \beta}{k\,21} \cdot V\,c\;(\,l\,/\,100\,kg\,)$$

$Cl_{tot.}$ Serumclearance-direkter Index für die pro Zeiteinheit aus dem zentralen Kompartiment eliminierte Substanzmenge in ml/min

3. Ergebnisse

3.1.1 Azlocillin 5 g

Die Abb.10 zeigt die Serumkonzentration des Azlocillins jedes Einzelprobanden und die Regressionskurve.
Die Regression entspricht einem offenen Zwei-Kompartmentmodell mit Verteilungsphase (t 1/2 α) und langsamer (t 1/2 β) Elimination. Die nach dem hier verwendeten Rechenmodell extrapolierte fiktive Serumspitzenkonzentration (Cp 0) wurde auf 519 $\pm$ 36,9 mg pro Liter festgelegt.
Die Serumkonzentration zum Zeitpunkt direkt nach Infusion der Probandin No. 10 konnte aus abnahmetechnischen Gründen nicht gemessen werden; die Probandin zeigte jedoch 5 Minuten nach Infusion mit 401 mg/l einen im 1 S-Bereich der Standardabweichung liegenden Wert. Nach 10 Stunden beträgt die Serumkonzentration noch 1,24 $\pm$ 0,36 mg/l (siehe Tab. 1).
Die Sekundärkonstanten der pharmakokinetischen Analyse ergaben eine schnelle Eliminationshalbwertzeit (t 1/2 α) von 13,4 $\pm$ 2,52 Min bei einer Eliminationskonstanten von 0,067 $\pm$ 0,01 Min^{-1}. Die Eliminationshalbwertzeit für die langsame Phase (t 1/2 β) lag bei 81,8 $\pm$ 1,72 Min. Die Eliminationskonstante für diese Phase errechnete sich damit auf 0,008 $\pm$ 0,00017 Min^{-1}.
Der Dosisumsatz pro Zeiteinheit (AUC) wurde auf 504 $\pm$ 41,7 h·mg/l und das Verteilungsvolumen der Substanz in der β-Phase der Elimination (Vdarea) mit 22,4 $\pm$ 4,29 l berechnet. Dieser Wert ist jedoch durch den Einzelwert des Probanden No.3 (Vdarea 60,5 l) verzerrt. Der Medianwert liegt hier bei 17,9 l. Die Clearance totalis als Maß der Substanzelimination aus dem Gesamtraum wurde mit 186 $\pm$ 30 ml/Min. errechnet (s. Tab. 17).
Die Ergebnisse der Urinsammelperioden lassen sich wie folgt zusammenfassen:

Während der ersten 4 Stunden wurden 2067 $\pm$ 292 mg Azlocillin, das entspricht 41,3 $\pm$ 5,8%, ausgeschieden.
In der zweiten Phase (4-8 h) stieg der ausgeschiedene Anteil mit 505 $\pm$ 345 mg auf 51,4 $\pm$ 9,2%.
Die Sammelperiode (8-12 h) erbrachte mit 165 $\pm$ 196 mg eine Gesamtausscheidung von 54,3 $\pm$ 11,4% und erhöhte sich in der letzten Phase (12-24 h) mit 35,7 $\pm$ 66,1 mg nur minimal auf 54,6 $\pm$ 11,1%.
Die Gesamtausscheidung lag in einem Bereich zwischen 39,3 - 79,4% (s.Tab.9, Abb. 11).

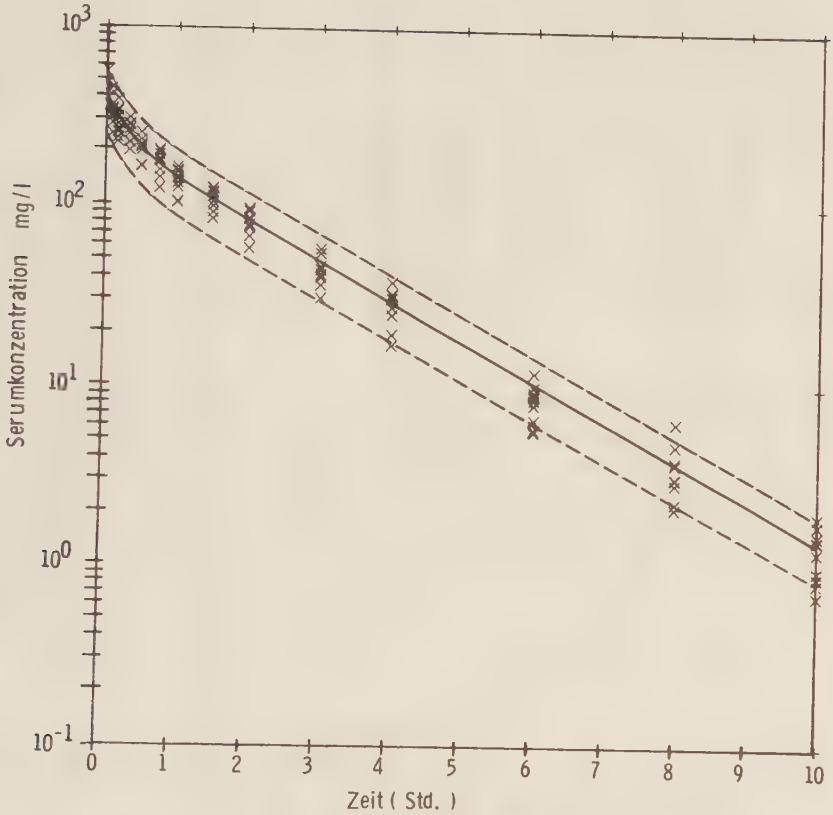


Abb. 10 Mittelwertskurve und 95,5% Vertrauensbereich nach Infusion von 5 g AZLOCILLIN (15 Min.) bei 10 Probanden.

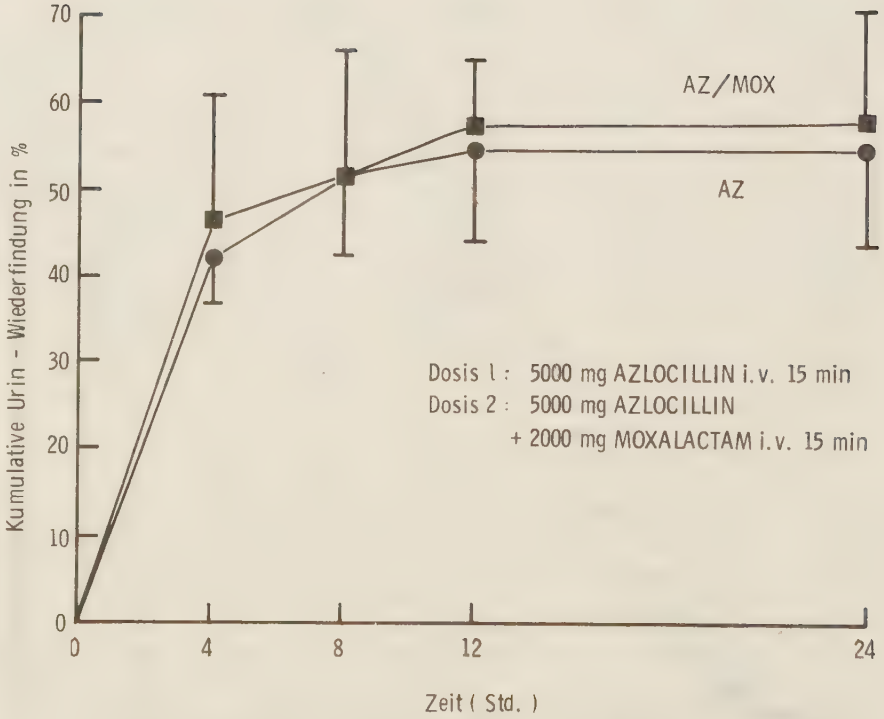


Abb.11 Urinausscheidungsraten von AZLOCILLIN und AZLOCILLIN in Kombination mit MOXALACTAM über 24 Std. in %.

3.1.2 Moxalactam 2 g

Die Regressionsanalyse der Moxalactam-Serumkonzentrationsverläufe zeigte ein offenes Zwei-Kompartmentmodell mit einem deutlich gestreckten Kurvenverlauf während der langsamen Eliminationsphase. Die maximalen Serumspiegel (Cp0) wurden auf 292 ± 17,8 mg/l berechnet. Die schnelle Verteilung der Substanz vom zentralen zum peripheren Kompartiment ging mit einer Halbwertszeit ($t\ 1/2\ \alpha$) von 10,4 ± 1,42 Min. entsprechend einer Eliminationskonstanten für diese Phase von 0,076 ± 0,009 $Min.^{-1}$ vor sich. Die Substanz hatte in der langsamen Eliminationsphase eine Halbwertszeit ($t\ 1/2\ \beta$) von 135 ± 5 Min. bei einer Konstanten von 0,0051 ± 0,00019 $Min.^{-1}$
Nach 10 Stunden war die Serumkonzentration auf 5,28 ± 1,67 mg/l (Tab. 3, Abb. 12) abgefallen. Der Mittelwert für den Dosisumsatz pro Zeiteinheit (AUC) lag bei 421 ± 13,2 h·mg/l. Das Verteilungsvolumen der Substanz in der langsamen Eliminationsphase (Vdarea) wurde mit 15,4 ± 0,4 l berechnet. Die totale Clearance betrug 79 ± 2 ml/Min. (Tab. 19).

Bei der Substanzwiederfindung im Urin wurden während der ersten 4 Stunden 1124 ± 261 mg, entsprechend 56,1 ± 13,3% gemessen. Dieser Anteil stieg in der Phase 4-8 h um 377 ± 267 mg auf 76 ± 10,6% an. Die Sammelperiode 8-12h erbrachte weitere 83,3 ± 67,4 mg und damit 79,6 ± 13,4%. In der letzten Phase 12-24 h wurden 101 ± 193 mg, entsprechend insgesamt 81,1 ± 22,4% der Substanz gemessen (Tab. 11, Abb. 13). Die Gesamtausscheidung in 24 h streute bei 10 Probanden zwischen 65,1 - 94,8%.

3.1.3 Azlocillin kombiniert mit Moxalactam

In der Abb. 14 sind die Serumkonzentrationsverläufe der 10 Probanden mittels linearer Regression dargestellt. Die Abb. 15 zeigt die Konzentrationsverläufe der Mittelwerte der Einzelprobanden der Versuche A (Azlocillineinzelapplikation) und C (Azlocillin in Gegenwart von Moxalactam) übereinanderprojiziert.
Mit dem in diesem Versuchsansatz verwendeten mikrobiologischem Verfahren lagen nach 6 h die Serumkonzentrationswerte aller Probanden unter der unteren Nachweisgrenze der Substanz. Die Abb. 18 zeigt den rechnerisch ermittelten verlängerten Kurvenverlauf der Serumkonzentrationsmittelwerte des Azlocillins in gemeinsamer Applikation mit 2 g Moxalactam.

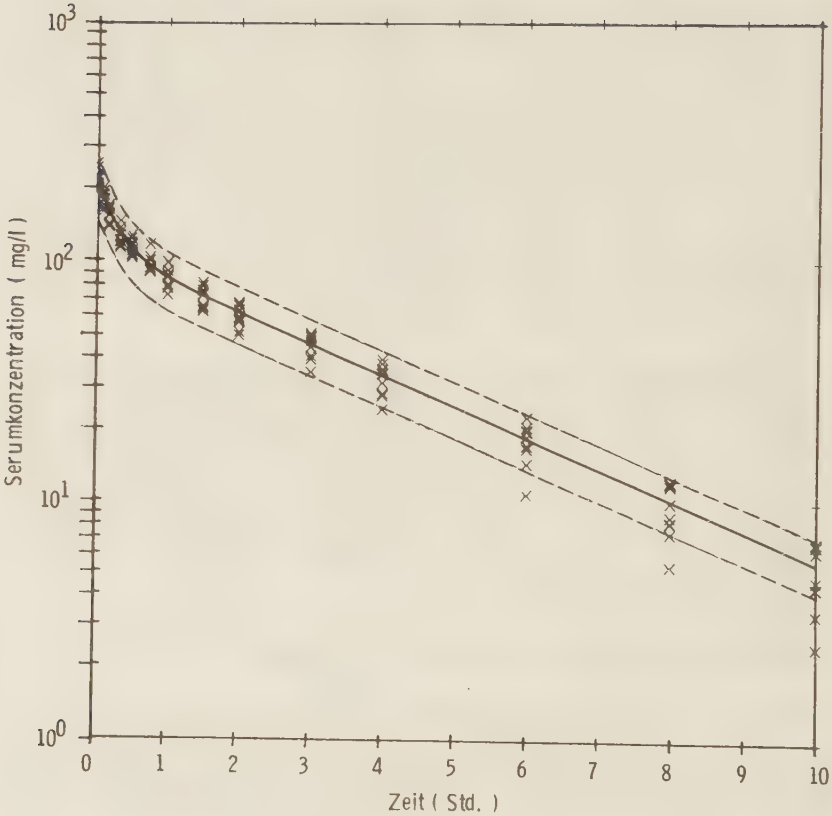


Abb. 12 Mittelwertskurve und 95,5% Vertrauensbereich nach Infusion von 2 g MOXALACTAM (15 Min.) bei 10 Probanden.

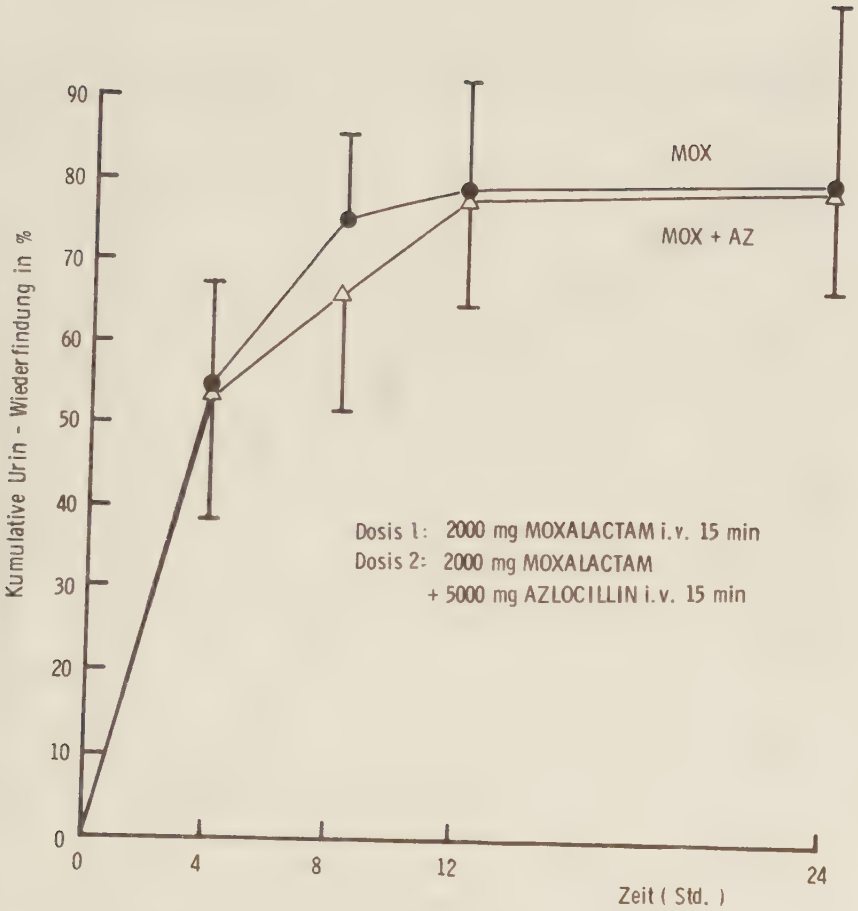


Abb. 13 Urinausscheidungsraten von MOXALACTAM und MOXALACTAM in Kombination mit AZLOCILLIN über 24 Std. in %.

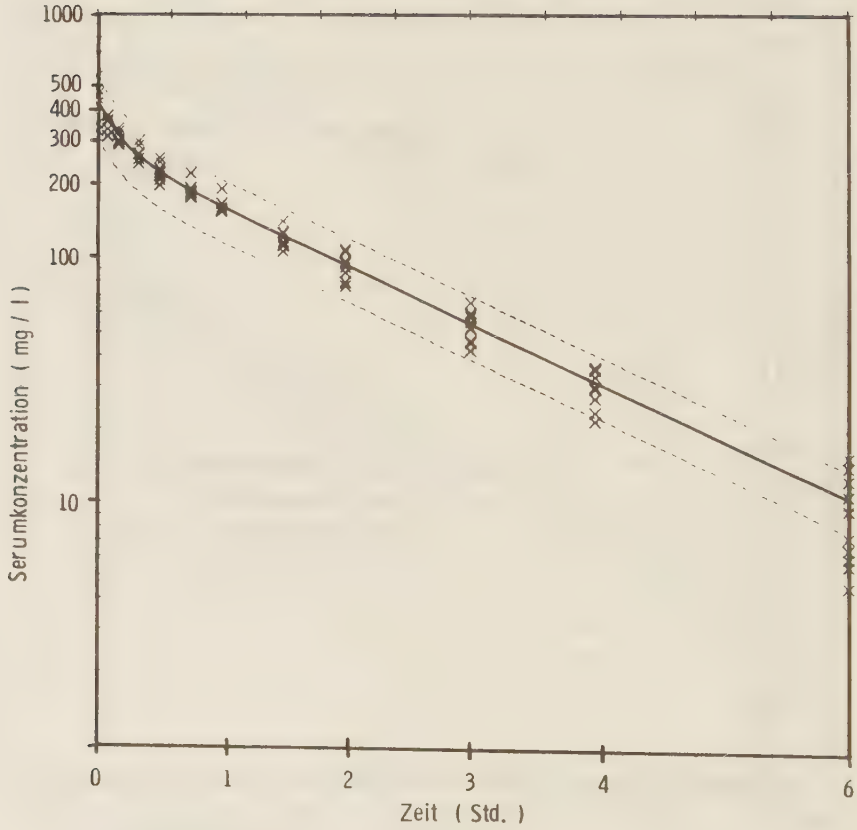


Abb. 14 Mittelwertskurve und 95,5% Vertrauensbereich für Azlocillin 5 g in Gegenwart von Moxalactam 2 g bei 10 Probanden

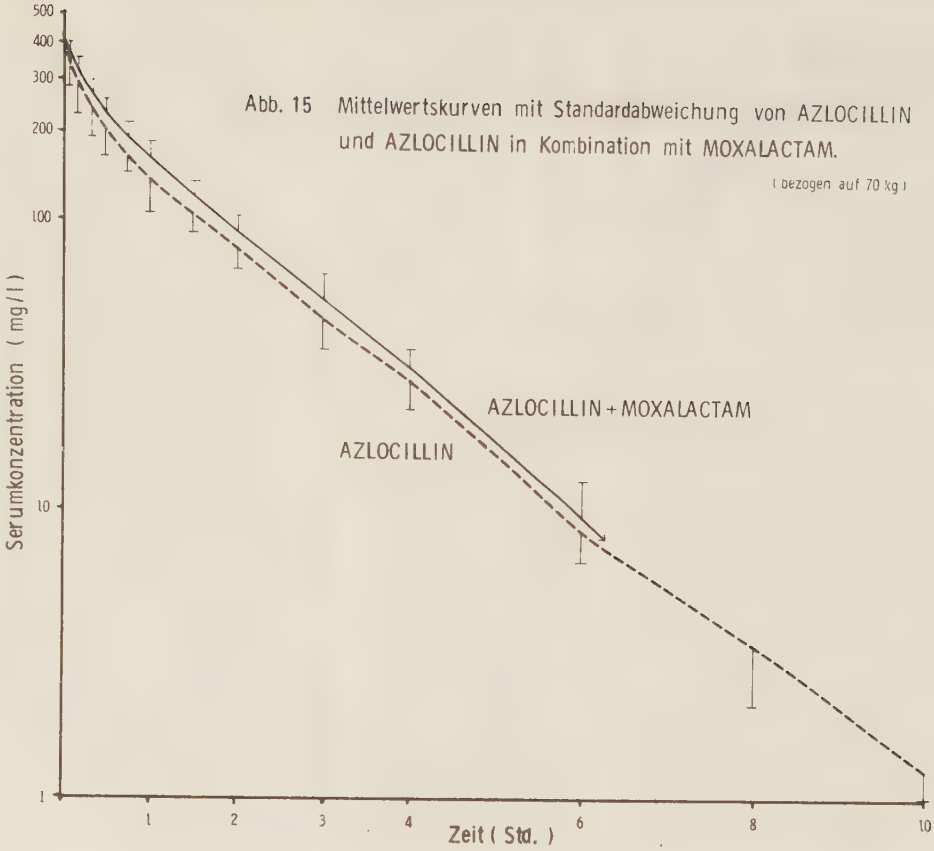


Abb. 15 Mittelwertskurven mit Standardabweichung von AZLOCILLIN und AZLOCILLIN in Kombination mit MOXALACTAM.

(bezogen auf 70 kg)

Die Serummaximalkonzentrationen (Cp0) wurden auf 557 ± 46,7 mg/l rechnerisch extrapoliert. Die schnelle Phase der Umverteilung hatte eine Halbwertszeit (t 1/2 α) von 20,1 ± 6,99 Min. bei einer Konstanten von 0,075 ± 0,01 $Min.^{-1}$ (Tab. 18).
Die β-Phase der Elimination lag bei einer Halbwertszeit (t 1/2 β) von 76,4 ± 3,42 Min. und einer zugehörigen Eliminationskonstanten von 0,009 ± 0,0004 $Min.^{-1}$. Die Fläche unter der Serummittelwertkurve (AUC) als Maß des Dosisumsatzes pro Zeiteinheit war in der gemeinsamen Applikation mit Moxalactam mit 581 ± 12,3 mg·h/l gegenüber der Einzelapplikation gesteigert. Das Verteilungsvolumen (Vdarea) lag bei 15,7 ± 0,41 l/100 kg.
Die totale Clearance der Substanz betrug 143 ± 3 ml/Min.
Die Urinausscheidung von Azlocillin über 24 Stunden im Kombinationsversuch mit Moxalactam ist in der Tab. 10 aufgezeichnet. In der Abb.11 sind die Ausscheidungen der Substanz aus den Versuchen A und C zusammen aufgeführt.

In der ersten Sammelperiode 0-4 h fanden sich 2323 ± 731 mg der applizierten Substanz wieder. Das entspricht 46,4 ± 14,6%.
Die 4-8 h Portionen enthielten 426 ± 184 mg entsprechend insgesamt 51,9 ± 14,5%. 192 ± 315 mg waren im Zeitintervall 8-12 h, das entspricht zusammen 57,9 ± 7,6%. Mit 81,5 ± 15,3 mg in der letzten Sammlung 12-24 h wurden damit 58,3 ± 13% der injizierten Substanz über die Nieren ausgeschieden.

3.1.4 Moxalactam in Gegenwart von Azlocillin

Die Abb. 16 stellt die Serumkonzentrationsverläufe nach linearer Regression dar. In der Abb.17 sind die Mittelwertkurven für die Versuchsansätze B (Moxalactam 2 g) und C (Moxalactam 2 g in Gegenwart Azlocillin 5 g) zusammen dargestellt. Der Versuch C dauerte 24 Stunden gegenüber 10 Stunden bei den Versuchen A und B. Zusätzliche Blutentnahmen fanden nach 12 Stunden und 24 Stunden statt (Tab. 4). Die pharmakokinetischen Parameter dieses Versuches wurden auf eine Versuchdauer von 10 Stunden berechnet, um die Vergleichsmöglichkeit nicht durch überproportionalen Einfluß der 12 und 24 Stundenwerte zu mindern.
Die maximalen Serumkonzentrationen (Cp0) betrugen durchschnittlich 241 ± 25,7 mg/l.
Die schnelle Verteilungsphase hatte eine Halbwertszeit von 39,3 ± 14,1 Min. mit einer Eliminationskonstanten von 0,0044 ± 0,009 $Min.^{-1}$.

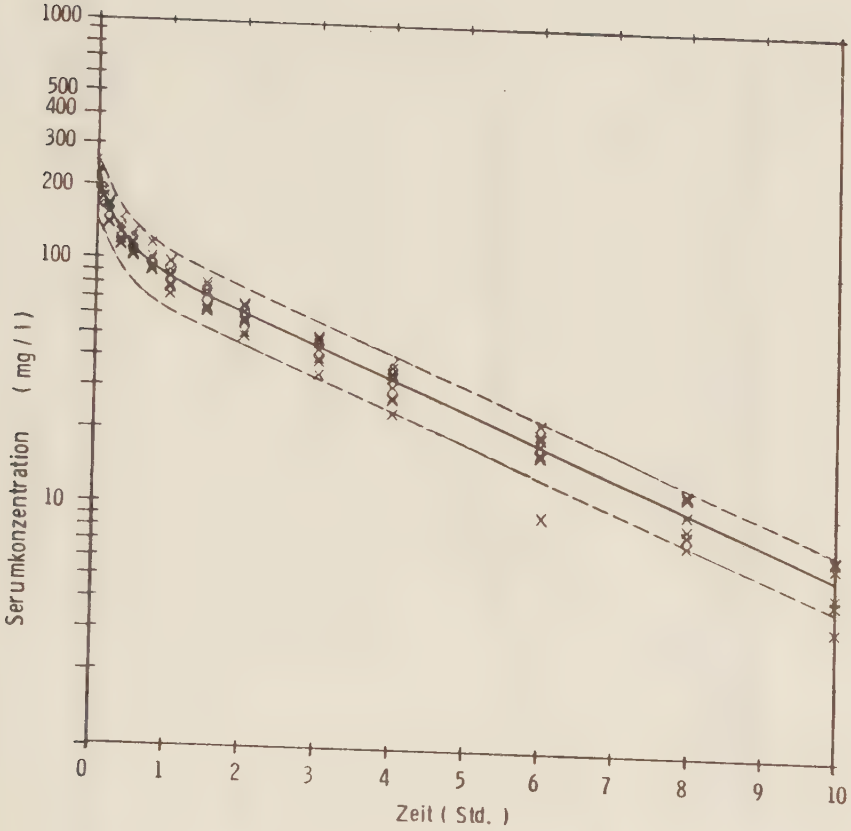


Abb. 16 Mittelwertskurve und 95,5% Vertrauensbereich für Moxalactam 2 g in Gegenwart von 5 g Azlocillin

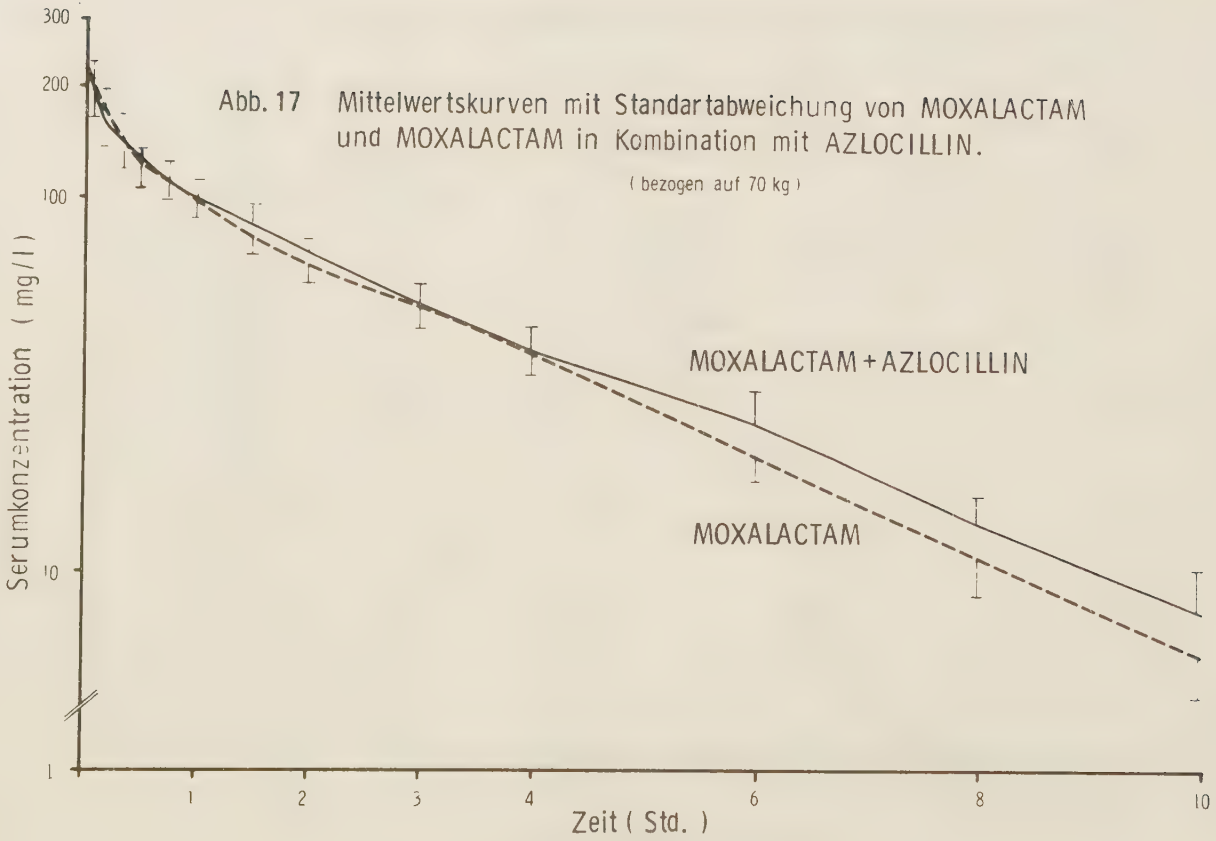


Abb. 17 Mittelwertskurven mit Standartabweichung von MOXALACTAM und MOXALACTAM in Kombination mit AZLOCILLIN.
(bezogen auf 70 kg)
MOXALACTAM + AZLOCILLIN
MOXALACTAM
Serumkonzentration (mg/l)
Zeit (Std.)
300
200
100
10
1
1
2
3
4
6
8
10

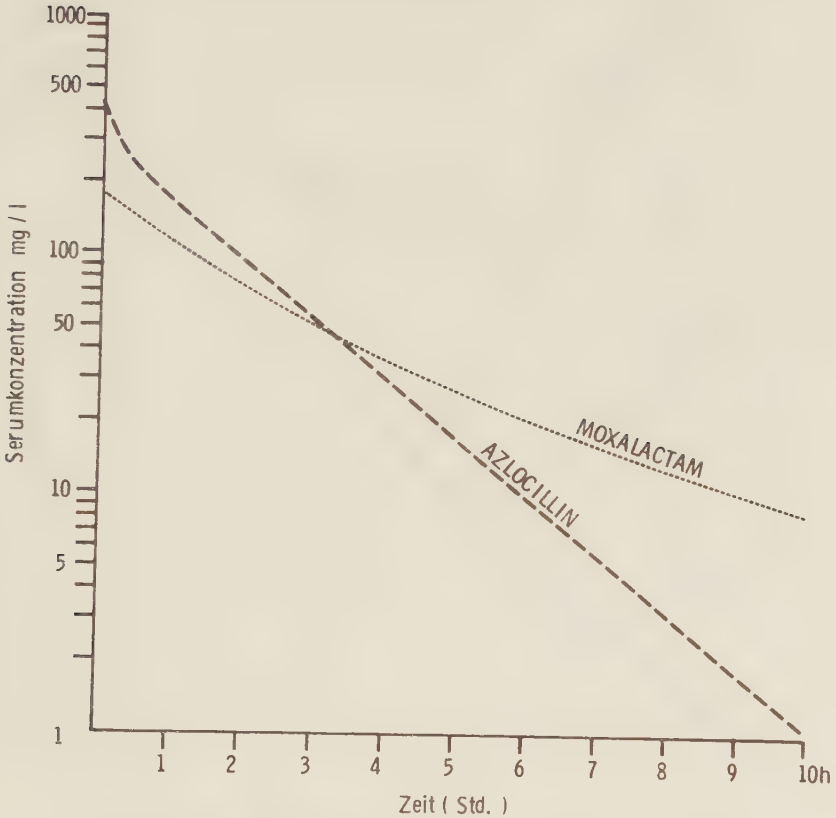


Abb. 18 Serumkonzentrationsverläufe von AZLOCILLIN und MOXALACTAM in gemeinsamer Applikation (Mittelwerte).

(Der Konzentrationsverlauf von AZLOCILLIN wurde mittels LØ2 Programm verlängert)

Abb. 19 Mittlere Serumkonzentrationen von 5 g AZLOCILLIN, ermittelt durch Bioassay und HPLC.

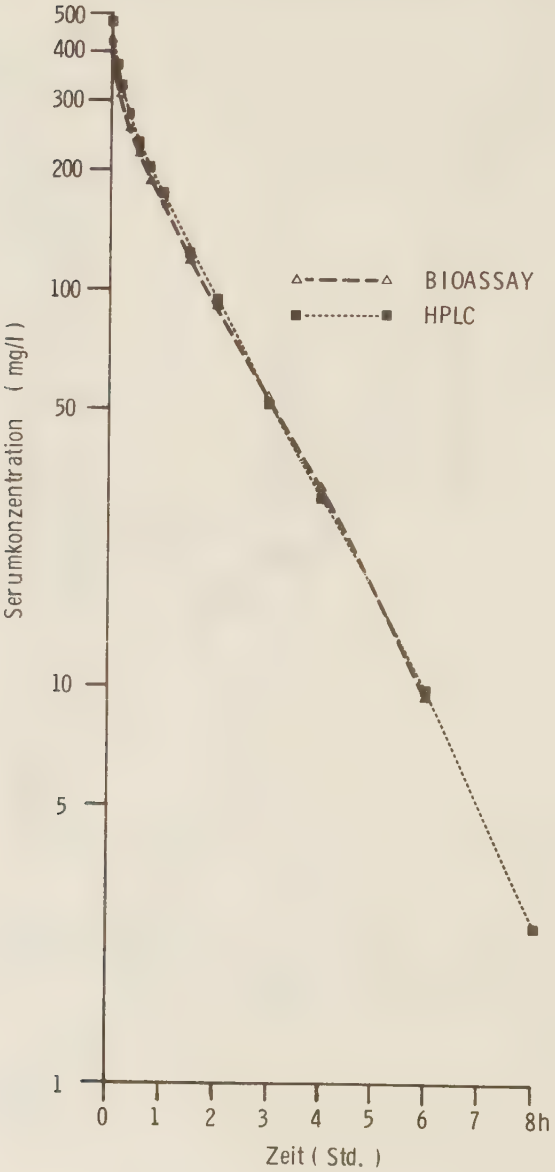
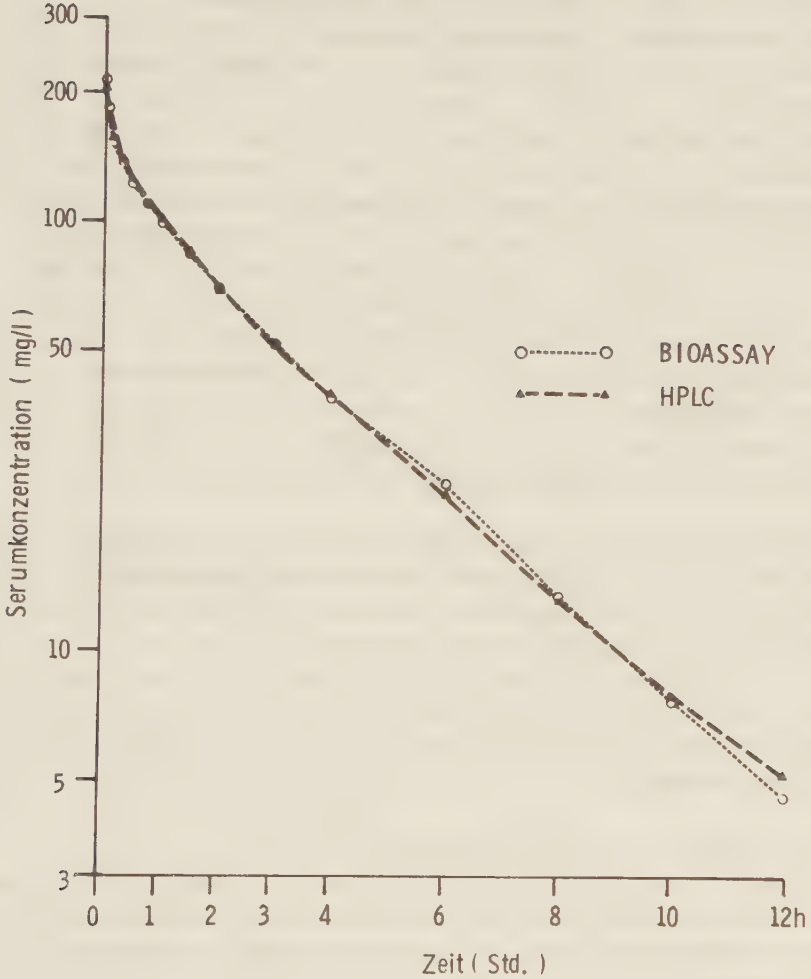


Abb. 20 Mittlere Serumkonzentrationen von 2 g MOXALACTAM, ermittelt durch Bioassay und HPLC.



Die Halbwertszeit für die Eliminationsphase betrug im Mittel 173 ± 12,5 Minuten (Tab. 20).
Die Konstante der β-Elimination war 0,0041 ± 0,0002 $Min.^{-1}$.
Dieser Wert lag damit ebenso wie der Dosisumsatz pro Zeiteinheit (AUC) mit 505 ± 13,1 mg · h/l höher als in der Einzelapplikation.
Die Substanz verteilte sich in der β-Phase in 16,5 ± 1,16 l/100 kg (Vdarea). Die totale Clearance der Substanz wurde mit 66 ± 1 ml/Min. bestimmt.
Die Urinausscheidung von Moxalactam im Versuch C zeigt Tab. 12. Abb. 13 projiziert die Ausscheidungskurven der Einzel- und Kombinationsapplikationen übereinander. Von der Substanz wurden 1087 ± 313 mg entsprechend 54,4 ± 15,6% in der ersten Sammelperiode (0-4 h) ausgeschieden. In der Zeit 4-8 h wurden 331 ± 119 mg ausgeschieden, der Prozentsatz stieg damit auf 65,7 ± 14,2%. Nach 8-12 h lagen weitere 176 ± 189 mg vor. Dies entspricht zusammen 78,2 ± 13,6%. Nach weiteren 64 ± 59 mg in der letzten Sammelphase wurden insgesamt in 24 h 80,3 ± 13,5% der infundierten Substanz renal ausgeschieden.

3.2 Ergebnisse der HPLC-Methode

Die Ergebnisse der Serumkonzentrationsverläufe für die HPLC-Methode der Versuche "Azlocillin in der Einzel- und Kombinations-Applikation" sind in den Tabellen 5 und 6 zusammengefaßt. Die Konzentrationsverläufe von Moxalactam sind in den Tabellen 7 und 8 verzeichnet.
Einzel- und Mittelwerte stimmen gut mit den Ergebnissen aus dem Bioassay überein (Abb. 19, 20). Die HPLC-Methode diente in unseren Versuchen als Referenzmethode zum Bioassay, eine pharmakokinetische Auswertung wurde nicht vorgenommen.

3.3 Ergebnisse der Serum-Bakterizidie

Die Tabellen 23 bis 28 führen die Einzelergebnisse der Serumbakterizidie-Untersuchungen für die 6 untersuchten Keimspezies nach 1 und 6 Stunden in den Versuchen A - C auf.
Abb. 21 und 22 geben eine graphische Darstellung der Serumbakterizidie Mittelwerte dieser Keime zum Zeitpunkt 1 und 6 Stunden nach Applikation der Einzel- und Kombinationsdosen.

Leerserum (Tab. 22)

Pseudomonas aeruginosa

MHK: Die Probandenseren 1, 4, 5, 6 und 7 zeigten in allen Ansätzen der Titerstufe 1:2 eine abgeschwächte Trübung, die als partielle Wachstumshemmung eingeordnet wurde.
Die Seren 2, 3, 8, 9 und 10 wuchsen einschließlich der Titerstufe 1:2 voll aus.

MBK: In keinem Ansatz konnte bakterizide Wachstumshemmung nachgewiesen werden.

E. coli

MHK: Die Probandenseren 2 und 3 hatten in diesem Ansatz in keiner Titerstufe einen wachstumshemmenden Effekt. In 7 Fällen ergab sich eine MHK von 1:4, 1 Probandenserum wurde in der wachstumshemmenden Wirkung auf die Titerstufe 1:2 festgelegt.

MBK: 5 Probandenseren zeigten keinen wachstumshemmenden Effekt (die Reihenverdünnungen wuchsen bis zur Titerstufe 1:2 voll aus).
4 Seren zeigten 99,9%ige Hemmung bei Titerstufe 1:4,
1 Serum zeigte dieses Ergebnis bis Titerstufe 1:2.

Enterobacter sakazakii

MHK: 9 Probanden zeigten Wachstumshemmung ab Titerstufe 1:4,
1 Proband bei 1:2.

MBK: 4 Probanden zeigten keine oder keine vollständige Bakterizidie (99%),
2 Probanden wurden auf Titerstufe 1:2 und 2 Probanden auf Titerstufe 1:4 festgelegt.

Klebsiella oxytoca

MHK: Keines der 10 Probandenseren zeigte Wachstumshemmung.

MBK: Keine bakterizide Wachstumshemmung.

Streptococcus faecalis

MHK: Keines der 10 Probandenseren zeigte Wachstumshemmung.

MBJ: Keine bakterizide Wachstumshemmung.

Proteus mirabilis

MHK: Keines der 10 Probandenseren zeigte Wachstumshemmung.

MBK: Keine bakterizide Wachstumshemmung.

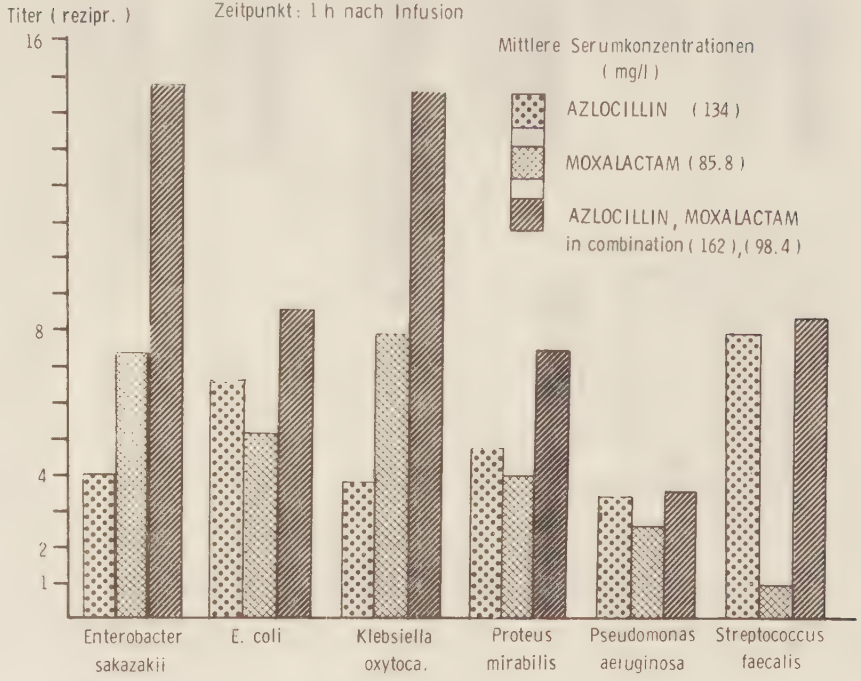
3.3.1 Versuch A: Azlocillin

Klebsiella oxytoca (Tab. 24)

1 h: Die MHK-Werte lagen einheitlich bei einer Serumtiterstufe von 1:4. Die Wachstumsgrenze war deutlich ablesbar.
Die MBK-Werte lagen ebenso einheitlich bei einer Titerstufe von 1:4, von der ab bei allen 10 Probanden 99,9%ige Hemmung des Keimwachstums festgestellt werden konnte.
Die Stufen 1:8 und 1:16 wuchsen mit dichtem Bakterienrasen aus.

6 h: Die MHK befand sich zwischen Titerstufe 1:1 (< 1:2) und 1:4.
Es fand sich in Einzelreihen partielle Wachstumshemmung, die den Übergang von Wachstum zur Hemmung bei den Probandenseren 1, 4, 5, 7 und 9 nur unvollkommen festlegen ließ.
Die MBK lag zwischen Titerstufe 1:1 (< 1:2) und 1:4. Die Probandenseren No. 1, 2, 3, 4 und 6 wuchsen bis einschl. Stufe 1:2 voll aus.

Abb. 22 Serum- Bakterizidie von AZLOCILLIN und MOXALACTAM
sowie der Kombination AZLOCILLIN / MOXALACTAM .
Zeitpunkt : 1 h nach Infusion



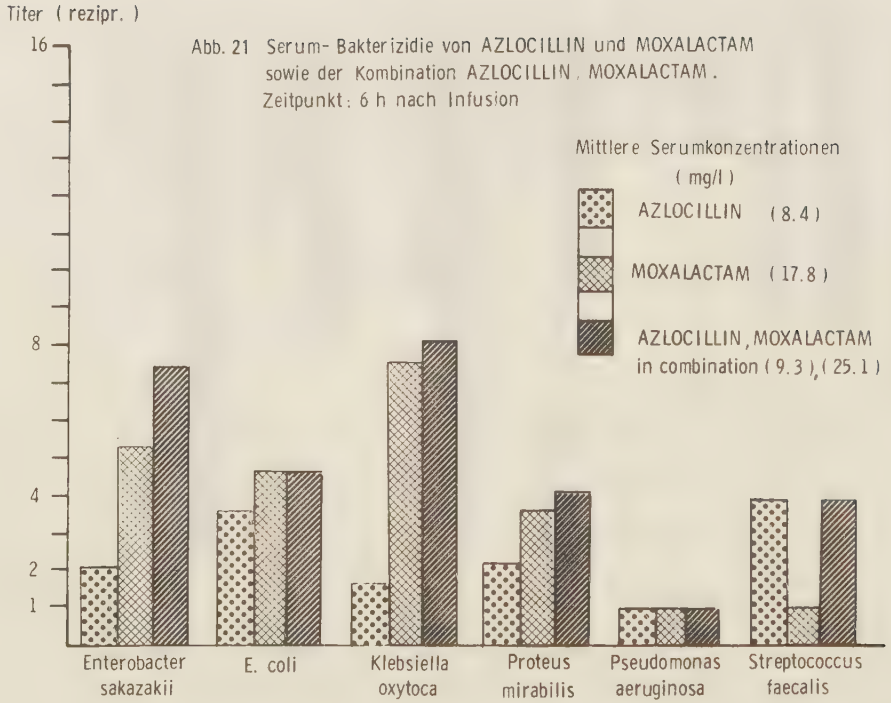


Abb. 21 Serum-Bakterizidie von AZLOCILLIN und MOXALACTAM sowie der Kombination AZLOCILLIN . MOXALACTAM . Zeitpunkt: 6 h nach Infusion

Mittelwerte (Ln x) = 1 h ((MHK 1:4 (MBK 1:4 6 h ((MHK 1:1,8 (MBK 1:1,5

E. coli (Tab. 23)

1 h: MHK-Werte reichten von 1:4 bis 1:16.
MBK-Werte lagen zwischen 1:4 und 1:16, die Ergebnisse stimmten bis auf Proband No. 2 (MHK - 1:8, MBK 1:16) überein.
Bakterizide Wachstumshemmung setzte in allen Fällen sprunghaft ein.

6 h: Die MHK wurde in 9 von 10 Fällen bei 1:4 (Proband No. 8, Stufe 1:2) registriert.
MBK Titerstufen lagen bis auf Proband No. 8 (Stufe 1:2) gleichmäßig bei 1:4.
Die bakterizide Wirkung wurde sprunghaft deutlich.

Mittelwerte (Ln x) = 1 h ((MHK 1:7,2 (MBK 1:6,9 6 h ((MHK 1:3,7 (MBK 1:3,7

Enterobacter sakazakii (Tab. 25)

1 h: Die MHK-Werte wurden einheitlich bei 1:4 abgelesen, die Werte waren in allen Fällen gut abgrenzbar, es bestand volle Übereinstimmung der Dreifachansätze.
Die MBK-Werte lagen ebenfalls gleichmäßig bei 1:4.

6 h: Die MHK-Werte reichten von 1:1 bis 1:4.
Teilweise Übergang mit partieller Wachstumshemmung.
Die MBK-Werte wurden zwischen 1:1 und 1:4 festgelegt.
Bei 4 Probanden wuchsen die Ansätze voll bis einschließlich Titerstufe 1:2 aus.
Bei Proband No. 2 differierte der Dreifachansatz um 2 Titerstufen (Mittelwert 1:2).

Mittelwerte (Ln x) = 1 h ((MHK 1:4 (MHK 1:2,3 ; 6 h ((MBK 1:4 (MBK 1:2

Proteus mirabilis (Tab. 26)

1 h: Als MHK wurde bei allen Probanden Titerstufe 1:8 ermittelt, die Abgrenzung der gehemmten Titerstufen war deutlich.
Die MBK-Werte lagen bei 7 Probanden bei 1:4, bei 3 Probanden bei 1:8. Bei den Probanden 1, 2, 3, 7, 8 und 9 wurde die MBK um eine Verdünnungsstufe niedriger als die MHK registriert. Probandenserum No. 9 zeigte in allen drei Ansätzen 99%ige Hemmung des Wachstums; No. 10 zeigte bei Titerstufe 1:4 eine Übergangszone von 99% in zwei von drei Ansätzen.

6 h: Die MHK-Werte wurden zwischen 1:1 und 1:4 abgelesen. Bei Proband 1, 2, 4, 5, 6, 7 und 9 übergangsweise partielle Hemmung der Titerstufe 1:4.
MBK-Werte lagen ebenfalls zwischen 1:1 (< 1:2) und 1:4. Dabei zeigten die Probandenseren No. 1, 3, 4, 5, 6 und 7 ganz oder teilweise nur 99%ige Wachstumshemmung, bei Serum No. 9 war keine Wachstumshemmung nachweisbar.

Mittelwerte (Ln x) = 1 h ((MHK 1:8 (MHK 1:4 ; 6 h ((MBK 1:4,9 (MBK 1:2,1

Streptococcus faecalis (Tab. 27)

1 h: Die MHK-Werte reichten bis auf Proband No. 10 (1:16) gleichmäßig bis Titerstufe 1:8. Die Dreifachansätze der Probandenseren 9 und 10 zeigten jedoch teilweise Hemmung bis zur Titerstufe 1:16. Das Probandenserum No. 10 hemmte das Keimwachstum in zwei von drei Ansätzen bis zur Titerstufe 1:16. Die Wachstumsstufen waren deutlich abgrenzbar.
Bei den MBK-Werten bestand bis auf Proband No. 10 volle Übereinstimmung mit den MHK-Werten. Stellenweise zeigte sich in den Dreifachansätzen 99%ige Hemmung des Wachstums im Übergangsbereich

(Probandenseren No. 1, 3, 4, 5, 8, 9 und 10).

6 h: Die MHK-Werte lagen bei allen Seren gleichmäßig bei Titerstufe 1:4. Es fanden sich jedoch verschiedene Trübungsgrade in den einzelnen Verdünnungsreihen, die auf partielle Wachstumshemmung schließen ließen, so daß die Abgrenzung nur abgeschätzt werden konnte. Klar abgrenzbare Ergebnisse lieferten die Probandenseren 2, 8, 10.
Die MBK Bestimmung brachte mit der Titerstufe 1:4 übereinstimmende Ergebnisse bei allen 10 Probandenseren. Die bakterizide Wirkung setzte sprunghaft ein, nur stellenweise kam es zu 99%iger Hemmung im Dreifachansatz (Probandenseren No. 1 und 8).

	(MHK 1:9,3		(MHK 1:4
Mittelwerte (Ln x) = 1 h	(	6 h	(
	(MBK 1:8		(MBK 1:4

Pseudomonas aeruginosa (Tab. 28)

1 h: Die MHK-Werte lagen bei 1:4.
Die Wachstumsgrenzen waren deutlich.
Die MBK-Werte wurden bis auf Proband No. 9 (1:1) bei 1:4 ermittelt
Bei den Probandenseren 1, 6, 7 und 8 kam es in Einzelansätzen nur zu 99%iger Hemmung des Keimwachstums.

6 h: Als MHK-Titerstufe registrierten wir einheitlich 1:1 (< 1:2).
Die MBK-Werte befanden sich ebenfalls bei 1:1.
In keinem Ansatz konnte bakterizide Wachstumshemmung nachgewiesen werden.

	(MHK 1:4		(MHK 1:1
Mittelwerte (Ln x) : 1 h	(	6 h	(
	(MBK 1:3,5		(MBK 1:1.

3.3.2 Versuch B: 2 g Moxalactam 15 Min. Infusion

Klebsiella oxytoca (Tab. 24)

1 h: MHK-Werte lagen bei 1:8 und 1:16.
Die Wachstumshemmung war deutlich abgrenzbar.

Die MBK reichte von 1:4 bis 1:16. Bei Proband No. 3, 4 und 8 lag die MBK eine Titerstufe niedriger als die MHK. Bei Proband No. 3 wuchsen in einer Reihe des Ansatzes die Titerstufen 1:2 bis 1:16 bei einer MHK von 1:8 voll aus.

6 h: Die MHK differierte um eine Titerstufe von 1:4 bis 1:8. In Einzelfällen partielle Wachstumshemmung im Übergangsbereich.
Die MBK Bestimmung erbrachte Titerstufen von 1:8 mit Ausnahme von Proband No. 4 (1:4). 99%ige Wachstumshemmung zeigte sich nur in 2 Fällen (Proband No. 9 und 10) und nur in je einer Reihe des Dreifachansatzes.

		(MHK 1:10	(MHK 1:7,5
Mittelwerte (Ln x) :	1 h	(	6 h (
		(MBK 1: 8	(MBK 1:7,5.

Enterobacter sakazakii (Tab. 25)

1 h: Die MHK lag zwischen Titerstufe 1:8 (9x) und 1:4 (Proband No. 6). Die Wachstumsgrenztiter waren deutlich erkennbar.
Die MBK-Werte verhielten sich in allen Fällen gleich (9x1:8, Proband No. 6 1:4). Es fand sich bei der Auszählung der Bakterizidie nur 99,9%ige Hemmung des Keimwachstums.

6 h: Als MHK wurden Werte von 1:4 bis 1:8 erfaßt. Eine deutliche Abgrenzung der Wachstumshemmung konnte auf Grund der unterschiedlichen Trübungsgrade in den Titerstufen nicht festgelegt werden.
Die MBK lag wie die MHK zwischen 1:4 und 1:8.
Die einzelnen Probandenseren verhielten sich hier übereinstimmend mit der MHK. In allen Fällen zeigte sich 99,9%ige Hemmung des Wachstums.

		(MHK 1:7,3	(MHK 1:5,2
Mittelwerte (Ln x) :	1 h	(	6 h (
		(MBK 1:7,3	(MBK 1:5,2.

Streptococcus faecalis (Tab. 27)

1 h: Dieser Keim sprach auf Moxalactam in den in diesem Versuchsansatz erreichten Konzentrationen nicht an. So konnte schon nach einer Stunde nach der Injektion keine Wachstumshemmung über die Titerverdünnungsreihe mehr nachgewiesen werden.
Ebenso verhielt es sich mit der MBK. In keinem Fall konnte bakterizide Wachstumshemmung beobachtet werden. Titerstufen wurden so bei 1:1 (< 1:2) festgelegt.

6 h: Auch in diesem Versuchsansatz konnte keine Wachstumshemmung beobachtet werden.

Mittelwerte (Ln x) :	1 h	(MHK 1:1 (MBK 1:1	6 h	(MHK 1:1 (MBK 1:1.

Proteus mirabilis (Tab. 26)

1 h: Die MHK lag in allen Fällen bei 1:4.
Die MBK konnte ebenfalls mit 1:4 für alle Probandenseren bestimmt werden. (Die Ablesung der Serumbakterizidie auf den Blutagarplatten ist wegen der Beweglichkeit des Keimes nicht so eindeutig wie bei den anderen verwendeten Keimspezies, jedoch konnten Einzelkolonien durchaus erkannt und ausgezählt werden).

6 h: Als MHK wurde 1:4 festgelegt. In allen Fällen war die Wachstumsabgrenzung undeutlich. Bis auf Probandenserum No. 9 (Titerstufe 1:1) zeigten alle Seren für den MBK-Wert Übereinstimmung mit dem MHK-Wert (1:4). In diesem Einzelfall wuchsen alle drei Verdünnungsstufen voll aus.

Mittelwerte (Ln x) :	1 h	(MHK 1:4 (MBK 1:4	6 h	(MHK 1:4 (MBK 1:3,5.

E. coli (Tab. 23)

1 h: Die MHK streute zwischen 1:4 und 1:16. Die Abgrenzung zur Wachstumshemmung war deutlich erkennbar, nur in Einzelreihen wurde die Ablesung durch stufenweise Trübungsgrade erschwert.
Die MBK lag zwischen 1:4 und 1:8. Bei Proband 4, 6, 7 und 9 lag der Wert um eine Titerstufe niedriger als die MHK. 99%ige Hemmung des Keimwachstums fand sich bei den Probandenseren 7, 9 und 10 in den Titerstufen 1:16 und 1:8 im Einzelansatz.

6 h: Zwischen 1:4 und 1:8 konnten die MHK-Werte bestimmt werden.
Die Grenztiter zwischen Hemmung und Wachstum waren nur undeutlich zu bestimmen.
Die MBK-Werte wurden ebenfalls zwischen 1:4 und 1:8 registriert. Nur bei Probandenserum 2 wurde die bakterizide Wirkung um eine Titerstufe niedriger festgelegt als die MHK. 99%ige Hemmung des Keimwachstums fand sich im Einzelansatz bei den Probandenseren 2, 3 und 7 jeweils in den Übergangstiterstufen.

	(MHK 1:6,9		(MHK 1:5,0
Mittelwerte (Ln x) : 1h	(	6 h	(
	(MBK 1:5,4		(MBK 1:4,6.

Pseudomonas aeruginosa (Tab. 28)

1 h: Die MHK reichte durchgehend bis 1:4. Die Wachstumsgrenzen waren deutlich erkennbar.
Bei der Bestimmung der MBK lagen die Titerstufen zwischen 1:1 (< 1:2) und 1:4. Dabei waren die bakteriziden Titerstufen in 2 Fällen um 1 bis 2 Titerstufen niedriger als die dazugehörigen MHK-Werte (Proband No. 2 und 6). 99%ige Wachstumshemmung im Übergangsbereich fanden sich bei den Probanden 3, 5 und 8(in allen drei Ansätzen bis zur niedrigsten Titerstufe) sowie bei Proband No. 4, 9 und 10 in einzelnen Ansätzen.

6 h: Die MHK wurde zwischen der Titerstufe 1:1 (< 1:2) und 1:4 erreicht. Die Wachstumsgrenzen waren durch partielle Wachstumshemmung in den Übergangsbereichen bei den Probanden 2, 6, 7, 8, 9 und

10 nicht eindeutig festzulegen.
Als MBK wurde einheitlich 1:1 (< 1:2) abgelesen. In keinem Ansatz wurde eine bakterizide Wirkung erkennbar. Damit lag die MBK bei den Probanden No. 7 um 2, bei den Probanden No. 2, 9 und 10 um 1 Titerstufe niedriger als die MHK.

		(MHK 1:4		(MHK 1:1,5
Mittelwerte (Ln x) :	1 h	(	6 h	(
		(MBK 1:2,6		(MBK 1:1.

3.3.3 Versuch C: Azlocillin plus Moxalactam

Klebsiella oxytoca (Tab. 24)

1 h: Die MHK differierte zwischen 1:8 und 1:16. Num im Probandenserum No. 10 lag sie bei Titerstufe 1:8.
Die MBK war übereinstimmend mit der MHK bei 1:16 bis 1:8 (Proband No. 10) anzusetzen. Die bakterizide Wirkung war in allen Fällen vollständig (99,9%).

6 h: Die MHK erreichte mit Ausnahme von Proband No. 1 (1:16) 1:8. Die Wachstumsgrenzen waren deutlich abgrenzbar.
Die MBK reichte in allen Fällen bis 1:8. Die bakterizide Wirkung war auch hier in allen Fällen vollständig (99,9%).

		(MHK 1:14,9		(MHK 1:8,5
Mittelwerte (Ln x) :	1 h	(	6 h	(
		(MBK 1:14,9		(MBK 1:8.

Enterobacter sakazakii (Tab. 25)

1 h: Die MHK-Werte gingen bis zur Titerstufe 1:16.
Die MBK-Werte wurden bis auf Probandenserum No. 2 (1:8) mit 1:16 bestimmt. In allen Ansätzen war die bakterizide Wirkung vollständig (99,9%).

6 h: MHK-Werte wurden zwischen 1:16 und 1:8 registriert. Die Wachstumsgrenzen waren sämtlich gut erkennbar.
MBK-Werte lagen bis auf Proband No. 5 (1:4) bei 1:8. Es waren drei

MBK-Werte um eine Titerstufe niedriger als die MHK (No. 1, 5 und 10).

		(MHK 1:16		(MHK 1:10
Mittelwerte (Ln x) :	1 h	(	6 h	(
		(MBK 1:14,9		(MBK 1:7,5.

E. coli (Tab. 23)

1 h: MHK-Werte reichten von 1:8 bis 1:16. Die Wachstumsgrenzen waren in allen Fällen deutlich.
Als MBK-Werte wurden Titerstufen zwischen 1:8 und 1:16 bestimmt. Dabei lag die MBK bei den Probandenseren No. 1 und 8 um eine Titerstufe niedriger als die MHK. Es fand sich in Einzelfällen 99%ige Wachstumshemmung (Grenztiter der Probanden 3, 4, 5, 7 und 9).

6 h: Die MHK fand sich zwischen 1:16 und 1:4. Die Wachstumsgrenzen waren in Einzelfällen durch partielles Wachstum nicht deutlich abgrenzbar.
Die MBK differierte zwischen 1:16 und 1:4. Mit Ausnahme von Proband No. 1 und 2 stimmten die MHK-und die MBK-Werte überein. Die Probandenseren No. 2 und 5 zeigten in Einzelreihen 99%ige Hemmung des Wachstums.

		(MHK 1:10,8		(MHK 1:5,6
Mittelwerte (Ln x) :	1 h	(	6 h	(
		(MBK 1: 8,9		(MBK 1:4,6.

Proteus mirabilis (Tab. 26)

1 h: Die MHK erreichte bis auf Probandenserum 1 (1:8) Titerstufe 1:16. Die Abgrenzung war in allen Ansätzen deutlich.
MBK-Werte wurden bis auf Probandenserum 1 (1:4) bei 1:8 gemessen. Damit lagen alle Probandenseren bei den MBK-Werten um eine Titerstufe niedriger als die MHK. In allen Fällen war die bakterizide Wirkung vollständig (99,9%).

6 h: Die MHK reichte konstant bis 1:8. Die MBK-Werte konnten ebenso einheitlich bei 1:4 bestimmt werden. Damit lagen alle Probandenseren in der Bakterizidie um eine Titerstufe niedriger als in der MHK.

Mittelwerte (Ln x) : 1 h ((MHK 1:14,9 (MBK 1:7,5) 6 h ((MHK 1:8 (MBK 1:4)

Streptococcus faecalis (Tab. 27)

1 h: Als MHK wurden Titerstufen zwischen 1:8 und 1:16 erfaßt. In Einzelfällen war die Wachstumsgrenze in den Verdünnungsreihen nicht eindeutig ablesbar.
MBK-Werte reichten ebenfalls von 1:8 bis 1:16. In allen Ansätzen war die bakterizide Wachstumshemmung vollständig (99,9%).

6 h: Die MHK bestimmten wir bei 1:4. Die Abgrenzung war deutlich.
Die MBK lag ebenfalls bei 1:4. Auch hier war die bakterizide Wirkung vollständig.

Mittelwerte (Ln x) : 1 h ((MHK 1:8,6 (MBK 1:8,6) 6 h ((MHK 1:4 (MBK 1:4.

Pseudomonas aeruginosa (Tab. 28)

1 h: Die MHK reichte konstant bis 1:8. Die Abgrenzung war in allen Fällen deutlich.
Die MBK war mit 1:8 mit Ausnahme von Probandenserum No. 8 (MBK 1:2) um eine Titerstufe niedriger als die MHK. Die Wachstumshemmung war in allen Fällen vollständig.

6 h: MHK-Werte wurden mit Ausnahme von Proband No. 1 (1:8) bei 1:4 abgelesen. Die Abgrenzung war in allen Fällen deutlich.
MBK-Werte waren mit 1:1 (< 1:2) im Durchschnitt um 2 (Proband No, 1 um 3) Titerstufen niedriger als die MHK-Werte. Bei Proband No. 7 stimmten beide überein. Bakterizide Wachstumshemmung konnte ausschließlich bei Proband No. 7 festgestellt werden.

		(MHK 1:8		(MHK 1:4,3
Mittelwerte (Ln x) :	1 h	(	6 h	(
		(MBK 1:3,7		(MBK 1:1.

3.4 Verträglichkeit

Die Präparate wurden überwiegend gut vertragen. Bei der Moxalactam-Einzeldosierung wurden in 2 Fällen am folgenden Tag mäßige Diarrhoen beschrieben.
In der Kombination von Azlocillin mit Moxalactam berichteten 4 Probanden über bitteren Geschmack während der Infusionen, teilweise mit Hitzegefühl. Die Laborparameter GOT, GPT, Blutbild, γ GT, alkalische Phosphatase und Kreatinin zeigten in keinem Fall signifikante Veränderungen.

4. Diskussion

4.1 Pharmakokinetik

Ein absolut exakter Vergleich pharmakokinetischer Parameter mit den Ergebnissen anderer Autoren, war aus verschiedenen Gründen nur bedingt möglich. Voraussetzungen wären gleiche Rahmenbedingungen des Versuchsablaufes, wie z.B. gleiche Probandenkollektive, identische diätetische Vorbereitungen der Versuchspersonen, speziell im Hinblick auf Flüssigkeitszufuhr sowie angeglichene Infusionszeiten und Dosierungen.
Diese Auflistung ließe sich entsprechend verlängern; ein zusätzliches Hindernis stellten die nur unvollständigen Definitionen der Infusionsmodalitäten dar.
So war der Begriff "Bolusinfusion" oft nicht eindeutig gegenüber der Kurzinfusion abgegrenzt. Da die rechnerische Ermittlung der pharmakokinetischen Parameter mittels Regressionsanalyse überwiegend die Methode der Wahl darstellte, sollten die Beobachtungszeiträume der Serumkonzentrationsverläufe im Vergleich mit ähnlichen Studien in Betracht gezogen werden. Informationen über den tatsächlichen Serumverlauf gehen in Kurzversuchen über maximal 6 h leicht verloren.

4.1.1 Azlocillin

Die Pharmakokinetik von Azlocillin ist bereits von verschiedenen Autoren umfangreich untersucht worden. Dabei wurden, wie eingangs erwähnt, unterschiedliche Infusionsverfahren bzw. Zeiten angewandt. Ein Großteil der Untersucher infundierte 30 Min (123, 127, 128, 145), andere gaben 15 Min. als Infusionszeiten an (214). Außerdem wurde die Kurzinfusion für 3 Min. gewählt (121). Ein Teil der Autoren gaben "Bolusinjektion" oder keine genaue Zeit an (25, 56). Zum Vergleich wurden nur Untersuchungen an nierengesunden Probanden herangezogen, die Versuche bzw. Therapien an Kindern oder Neugeborenen blieben unberücksichtigt. Die Serumkonzentrationen direkt nach Infusionsende lagen zwischen 284 und 538 mg/l bei einem Mittelwert von 414 mg/l und einer Standardabweichung von 87,7 mg/l.
LODE et al. (127) kamen nach halbstündiger Infusion der gleichen Dosis zu übereinstimmenden Ergebnissen. Die Serumspiegel fielen nach 10 h auf 1,24 mg/l ab. Der Kurvenverlauf korrelliert somit sehr gut mit der von

LODE et al. (1977) bestimmten Serumverlaufskurve mit 4,7 mg/l nach 8 h, gegenüber 3,4 mg/l zur selben Zeit in unserem Versuchsansatz. Die Halbwertszeit lag bei 81,8 ± 1,7 Min. für die langsame Phase der Elimination. WITTMANN (214) errechnete nur 66 Min. als t 1/2 β für 5 g Azlocillin nach 15 Min. Infusion. MODR (143) bestimmte 70,2 Min. für die gleiche Dosis bei 30minütiger Infusion. LODE et al. (127) lagen mit einer Halbwertszeit von 77,5 Min. unter gleichen Bedingungen geringfügig darüber. BERGAN (24) errechnete mit 90 Min. die längste Halbwertszeit für die 5 g Dosierung. Andere Autoren (41, 56, 79) bestimmten bei unterschiedlichen Dosierungen zwischen 2 g bis 4 g Halbwertszeiten in einem Bereich von 47 Min. (56) bis 110 Min. bei Patienten nach Cholezystektomie und T-Drain (79). Das Verteilungsvolumen im steady state (Vdss) lag bei 18,1 ± 2,54 l/100 kg Körpergewicht. Es liegt damit knapp über dem gesamten Flüssigkeitsraum des Körpers. MODR (143) fand mit 19,4 l/100kg ähnliche Ergebnisse. LODE et al. (127) bestimmten 1977 ebenfalls 19,4 l/100 kg bzw. 18,5 l/100 kg für die 4 g Dosierung (128). Insgesamt wurden Verteilungsvolumina von 17,7 l/100kg (56) bis 22,4 l/100 kg (121) bei unterschiedlichen Dosierungen beschrieben (25, 127, 207).

Das in unseren Untersuchungen errechnete mittlere Verteilungsvolumen in der β-Phase der Elimination (Vdarea), lag bei 22,4 l/100 kg. Der Medianwert errechnete sich hier bei 17,9 l/100 kg. Vdarea wurde von anderen Untersuchern mit 11,3 - 15,1 l/100 kg berechnet (25, 123, 143).

Insgesamt liegen sämtliche Verteilungsvolumina innerhalb der Grenzen des Extrazellulärraumes. Als Fläche unter der Serumverlaufskurve (AUC) wurden 504 ± 41,7 h x mg/l errechnet. Dieser Dosisumsatz pro Zeiteinheit zeigte große Schwankungsbreite unter den Autoren (121, 123, 143, 214) und reichte von 789 µg/ml x h (cott.) für eine Versuchsanordnung mit 5 g/ 30 h (127) bis herunter auf 407 h x mg/l bei 4 g 30 Min. Infusionszeit (128). Vergleichbare Ergebnisse lieferten nur Versuchsanordnungen mit ähnlich kurzen Infusionszeiten und gleicher Dosierung. Die von der Substanz pro Zeiteinheit aus dem Gesamtraum eliminierte Menge (CL_{tot}) wurde auf 186 ml/Min. berechnet. Sie stimmt somit gut mit den Ergebnissen von MODR (143) mit 170 ml/Min. bzw. LEROY (121) mit 153 ml/Min. überein. GUNDERT (79) stellte 138 ml/Min. fest; in der 5 g Applikation ergab sich bei MODR (143) eine Cl_{tot} von 110 ml/Min. Die Wiederfindung im Urin nach 24 h ergibt mit 54,6 ± 11,1% ein den bisherigen Untersuchungen unvergleichbares Ergebnis. Die Urinwiederfindung der einzelnen Untersuchungen spiegelt die

interindividuelle Schwankungsbreite dieser Größe für die Substanz wieder. So fanden LODE et al. (128) 32,6% und FLIEGEL et al. (56) 64% nach 24 h. BERGAN (23) fand 25 - 35% der applizierten Dosis unmetabolisiert im Urin wieder.

4.1.2 Azlocillin in Kombination mit Moxalactam

Die Serumkonzentration des Azlocillins zum Zeitpunkt direkt nach der Infusion lag mit 416 ± 79,5 mg/l fast gleich mit der Einzelapplikation von 414 ± 87,7 mg/l. Über den gesamten Kurvenverlauf der langsamen Elimination lagen die Serumspiegel ca. 10% über der Einzelapplikation. Diese Beobachtungen decken sich tendenziell mit Untersuchungen von ADAM und BAUER (7), die die Kombination von Breitspektrumpenicillinen mit Oxacillin nach Anregung durch die ersten Publikationen von HITZENBERGER (84) 1970 über Interferenzen in der Kinetik von Benzylpenicillin und Oxacillin untersuchten. In der Kombination von Mezlocillin mit Oxacillin wurden ebenfalls deutliche Anstiege der Serumkonzentrationsverläufe beobachtet (54), die nach Auffassung von ADAM und BAUER nicht als Kumulation zu werten sind. Vielmehr könnte es sich um Konkurrenz bei der aktiven Ausscheidung über die Nierentubuli handeln. Dafür sprächen ebenfalls die ansteigenden Halbwertszeiten und Flächen unter der Serumkurve sowie abnehmende Clearancen der Substanzen in der Kombination (54).
Die in unseren Untersuchungen beobachteten Veränderungen sind von geringerem Ausmaß als bei oben zitierten Autoren. Die Fläche unter der Serumkonzentrationsverlaufskurve zeigt daraus resultierend einen Anstieg von 504 ± 41,7 auf 581 ± 12,3 mg x h/l in der Kombination .
Nach ADAM und BAUER ist bei der Kombination v.β-Lactam-Antibiotika ein grundsätzlich gleichgerichteter Effekt wie bei der Dosis erhöhung der Einzelsubstanz vorauszusetzen. Nach Untersuchungen von BERGAN (23) zeigt Azlocillin unter den Acylureidopenicillinen in allen pharmakokinetischen Parametern die deutlichste Dosisabhängigkeit. Dieser Effekt wurde für die AUC als besonders ausgeprägt hervorgehoben und kommt als Erklärungsansatz für die Beobachtungen möglicherweise in Frage. Die Verteilungsvolumina (Vd_{SS}) der Substanz in der Kombination mit Moxalactam zeigten deutlich abnehmende Tendenz. Sie fallen von 18,1 ± 2,54 l/100kg auf 14,2 ± 0,25 l/100 kg in der Kombination. Diese Beobachtung entspricht den von NAUMANN und LODE (147) gefundenen Ergebnissen über das Verhalten des Verteilungs-

volumens von kombinierten Dosen von Ampicillin mit Oxacillin. Dabei wurde eine Verkleinerung des Verteilungsvolumens bei kombinierter Applikation beider β-Lactame für die Einzelkomponenten beschrieben. Nach GILBALDI und SCHWARZ (68) ist dieser Effekt als Probenecid-Effekt bei β-Lactamantibiotika durch Hemmung der extrarenalen Transportmechanismen beschrieben. Er tritt ebenso bei Dosiserhöhung der Einzelsubstanz durch Überschuß am Transportenzym auf. Prinzipiell entspricht damit das Verhalten von Azlocillin in der Kombination mit Moxalactam im Hinblick auf das Verteilungsvolumen (Vd_{ss}) einer Dosiserhöhung der Einzelsubstanz. Eine Verlängerung der Halbwertszeit (t 1/2 β) konnte dagegen nicht beobachtet werden. Sie veränderte sich nicht signifikant von 81,8 ± 1,7 Min. auf 76,4 ± 3,42 Min. in der Kombination. LEROY (121) konnte für Azlocillin unter Probenecid-Medikation eine deutliche Verlängerung der Halbwertszeit feststellen. Andere Autoren kamen zu übereinstimmenden Ergebnissen (23, 41, 143).
Eine Beeinflussung der tubulären Sekretion durch Konkurrenz um renale Transportenzyme mit Moxalactam, ist damit nicht festzustellen. Moxalactam wird nach Untersuchungen von DASANTE (38) renal filtriert. Dagegen fällt die totale Clearance von Azlocillin in der Kombination signifikant ($p = 0,05$) von 186 ± 30 ml/Min. auf 143 ± 20 ml/Min. ab. Nach BERGAN (25) resultiert diese Veränderung möglicherweise auch aus Interferenzen in der Biotransformation bzw. bilären Sekretion.
So wird beschrieben, daß mit steigenden Dosierungen der Anteil unmetabolisierten Azlocillins steigt (24). GUNDERT (79) vermutete den metabolischen Anteil der totalen Clearance bei ca. 50%. Bekanntermaßen erfolgt die Elimination des Azlocillins zu einem hohen Prozentsatz über die Ausscheidung mit der Galle (45). SCHELD et al. (176) beobachteten in ihren pharmakokinetischen Studien Phänomene, die für Moxalactam eine Zirkulation über einen enterohepatischen Kreislauf möglich erscheinen lassen. Inwiefern dabei Überangebote von Azlocillin auf diese Eliminationsfunktionen durch kompetitive Wirkung von Moxalactam am Trägerprotein oder durch Konkurrenz bei der bilären Sekretion zur Wirkung kommen, konnte vorerst nicht geklärt werden. Die Urinwiederfindung ändert sich im Vergleich zur Einzelgabe nur geringfügig. Der Anstieg von 54,6 ± 11,1% auf 58,3 ± 13% war nicht signifikant. Andere Autoren berichteten über deutliche Anstiege der Urinwiederfindung in Kombination mit anderen β-Lactamantibiotika (54, 147), für die überwiegend geringere Anteile proteingebundener, unfiltrierbarer Substanz verantwortlich gemacht wurden.

Für die Kombination von Azlocillin mit Moxalactam scheint dieser Effekt eher im Hintergrund zu stehen.

4.1.3 Moxalactam

Die Pharmakokinetik wurde bisher von verschiedenen Autoren in diversen Dosierungen und unter unterschiedlichen Applikationstechniken untersucht. Für diese Arbeit wurden nur Studien über die intravenöse Infusion zum Vergleich herangezogen. Dabei wurden überwiegend 1 g oder 2 g Dosierung verabreicht. Die meisten Untersucher infundierten 20 - 30 Minuten (13, 85, 87, 122, 150, 152). Ein Teil bevorzugte kürzere Infusionszeiten von 3 - 5 Min. (27, 118, 132).

Die Pharmakokinetik der Substanz zeichnete sich durch eine lange Eliminationshalbwertszeit (t 1/2 β), in unserem Versuch 135,4 $\pm$ 5 Min. aus. Sie lag damit über denen vergleichbarer parenteraler Cephalosporine, wie Cefotaxim und Ceftazidime (132). Dieses Ergebnis korrelierte gut mit den Berechnungen von PETERSON (153) der bei 2 g Dosierungen eine Halbwertszeit von 138 Min. feststellte.

Auch PARSONS (152) kam auf 138 Min. für die Eliminationsphase, allerdings in der 1 g Dosierung. Insgesamt war festzustellen, daß die in verschiedenen Untersuchungen bestimmten Halbwertszeiten nicht als dosisabhängig anzusehen waren (85, 87). So errechneten SCHELD et al. (176) bei einer 1 g Dosierung 207 Min. als t 1/2 β. ISRAEL et al. (87) konnten jedoch mit 2g Dosierungen nur 120 Min. messen. Das Verteilungsvolumen im steady state (Vd_{SS}) lag in unserer Untersuchung bei 14,0 $\pm$ 0,03 l/100 kg. HUMBERT (85) bestimmte 15 - 18 l/100 kg für die 2 g Dosis und damit das Verteilungsvolumen des gesamten Körperwassers. SRINIVASAN (194) beschrieb in seinen Untersuchungen mit 1 g Moxalactam 15,6 l/100 kg als Verteilungsraum. Die Angaben anderer Autoren schwankten stark.

So gaben ISRAEL et al. (87) 23 l/100 kg, SCHELD et al. (176) 44 l/100 kg an. Die Mehrzahl der Autoren legten sich jedoch auf Verteilungsvolumina zwischen 15 - 20 l/100 kg fest (38, 85, 98, 132, 152, 153, 194).

Das Verteilungsvolumen erschien bei Vergleich der pharmakokinetischen Parameter verschiedener Untersuchungen nicht dosisabhängig, LÜTHY (132) beobachtete jedoch unter Probenecidgabe einen diskreten Anstieg des Verteilungsraumes.

Die Fläche unter der Serumkurve als Maß für den Dosisumsatz pro Zeiteinheit wurde in unseren Untersuchungen auf 421 ± 13,2 mg x h/l berechnet. LEROY (122) fand 516 mg x h/l und korreliert damit relativ gut mit unseren Ergebnissen. KEMMRICH und LODE (98) bestimmten für die 1 g Dosis 192 mg x h/l. Die AUC ist insgesamt zwischen den Untersuchungen bei gleichen Dosierungen starken Unregelmäßigkeiten unterworfen. Ein signifikanter Probenecideffekt konnte dabei nicht festgestellt werden (132). Die totale Clearance konnten wir mit 79 ± 2 ml/Min. messen. DASANTE (38) konnte ebenso wie SHIMADA (186) in seinen Untersuchungen über Hemmbarkeit renaler bzw. extrarenaler Transportmechanismen mit Probenecid keinen Effekt auf die Clearance feststellen. ARONOFF (13) bestätigte die gute Korrelation der Creatinin Clearance mit der totalen Clearance von Moxalactam. SCHELD et al. (27) zeigten bei Patienten mit verschiedenen Graden der Niereninsuffizienz einen deutlichen Zusammenhang zwischen der glomerulären Filtration und der Moxalactam Clearance. Er postulierte 90% der Clearance totalis als renale Clearance. Wegen ungeklärter Verluste aus dem zentralen Kompartiment äußerte SCHELD den Verdacht einer enterohepatischen Zirkulation des Moxalactams. LEROY et al. (122) spekulierten über eine mögliche tubuläre Reabsorption, da nach ihren Berechnungen die Clearance des Moxalactams geringer als die Creatinin Clearance ausfiel. Insgesamt kann für Moxalactam die glomeruläre Filtration als Hauptelimination sweg angesehen werden. Die in unseren Untersuchungen gefundenen Werte für die totale Serumclearance korrelierten gut mit denen anderer Autoren. So errechneten ISRAEL et al. (87) für die 2 g Dosierung ebenfalls 79 ml/Min. KEMMRICH und LODE (98) bestimmten 86 ml/Min. für 1 g Moxalactam. Nach 24 h wurde nach unseren Auswertungen 80,4 ± 22,4% aktiver Substanz im Urin ausgeschieden. Dieses Ergebnis stimmt mit dem anderer Untersucher überein. Die Bandbreite der Urinausscheidung liegt bei ihnen zwischen 90% (118) und 60,2% (153). SHIMADA (186) berichtete über 90%ige Urinausscheidung bereits nach 10 h.

4.1.4 Moxalactam in Kombination mit Azlocillin

Die Serumkonzentrationen verlaufen in Gegenwart von 5 g Azlocillin annähernd gleich wie in der Einzelapplikation. Moxalactam zeigte in der Einzeldosierung geringfügig höhere Werte direkt nach der Infusion. Ab 2 h lagen die Konzentrationen in der Kombination etwas höher (Abb. 17).

Die Konzentrationsunterschiede waren nach statistischer Auswertung mit dem Vorzeichentest (172) im gesamten Kurvenverlauf nicht signifikant. Die Halbwertszeit steigt dagegen in der Kombination signifikant von 135 ± 5,0 Min. auf 173 ± 12,5 Min. an ($p = 0,01$). Obwohl für Moxalactam eine aktive Sekretion zumindest über die Nieren nicht nachgewiesen werden konnte (38, 65, 186), findet sich hier möglicherweise eine Übereinstimmung mit der von LÜTHY (132) formulierten Beobachtung, daß für Moxalactam sekretorische Transportmechanismen durch Probenecid hemmbar sind. Neben der verlängerten Halbwertszeit fand er unter Probenecid ein vergrößertes Verteilungsvolumen. Dieser Punkt konnte in unseren Arbeiten nicht nachvollzogen werden; das Verteilungsvolumen im steady state (Vd_{ss}) blieb ebenso wie der Verteilungsraum in der β-Phase der Elimination (Vd_{area}) nahezu unverändert. Der Dosisumsatz / Zeiteinheit (AUC) stieg in Gegenwart von Azlocillin signifikant von 421 ± 13,2 auf 505 ± 13,1 mg x h/l an ($p = 0,001$). Dafür dürfte in erster Linie die für Moxalactam in der Kombination während der β-Phase der Elimination erhöhte Serumspiegelkurve verantwortlich sein. Die totale Clearance fiel in der Kombination mit Azlocillin signifikant von 79 ± 2 ml/Min. auf 66 ± 1 ml/Min. ab ($p = 0,01$). Hierfür können möglicherweise extrarenale Faktoren als Erklärungen herangezogen werden. Für Moxalactam wurden Überlegungen über die Existenz eines enterohepatischen Kreislaufes angestellt (13, 176), die extrarenale Elimination beträgt nach Berechnungen von SCHELD (27) jedoch lediglich 10% der totalen Clearance. Im Hinblick auf den relativ hohen Anteil an biliarer Elimination des Azlocillins (45) bzw. den ca. 50%igen Anteil der Metabolisierung an der totalen Clearance (24), erscheinen extrarenale Interferenzen beider Substanzen nicht ausgeschlossen.
Bei Moxalactam ergaben sich in den Ausscheidungsmengen nach 24 h gegenüber der Einzelapplikation keine Unterschiede.

Zusammenfassung

Die kombinierte Applikation von 5 g Azlocillin mit 2 g Moxalactam bewirkte in den Serumverlaufskurven nur unwesentliche Veränderungen gegenüber der Einzeldosierung im Sinne einer Erhöhung der Kurvenverläufe. Eine gegenseitige Beeinflussung der Elimination mit pharmakokinetisch signifikanten Veränderungen, konnte nicht eindeutig in der bisher von Probenecid bekannten Weise festgestellt werden.

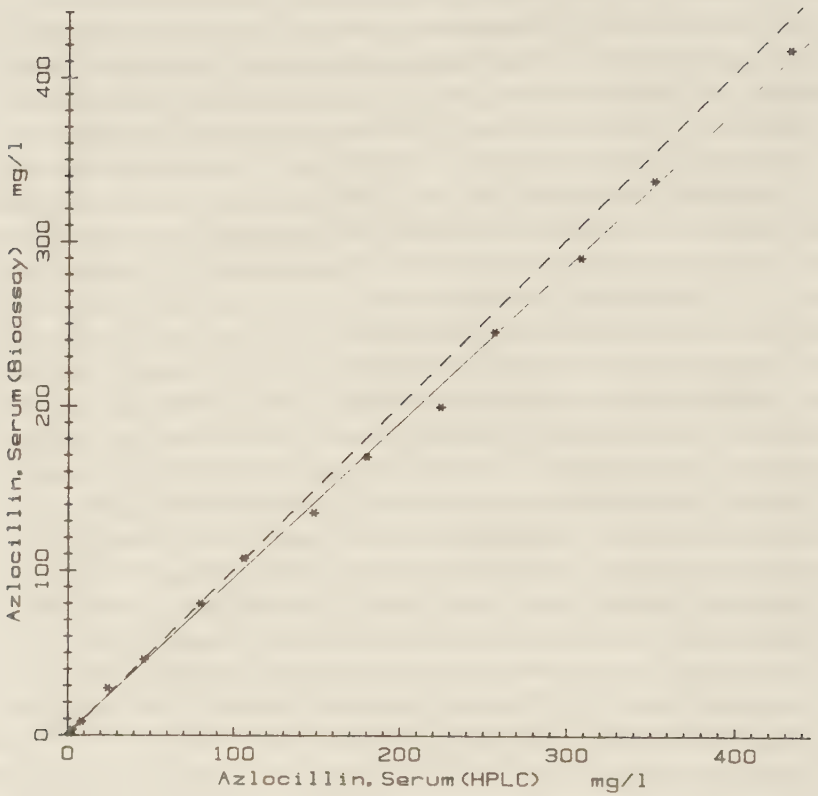


Abb. 23 Methodenvergleich: AZLOCILLIN im Serum

x = HPLC y = Bioassay

$\bar{x}$ = 155,2 mg/l $\bar{y}$ = 147,2 mg/l n = 14

$\bar{y}_{Bioassay} = 0,941 \cdot x_{HPLC} + 1,2 mg/l$

Vorzeichentest: $p > 0,05$ nicht signifikant

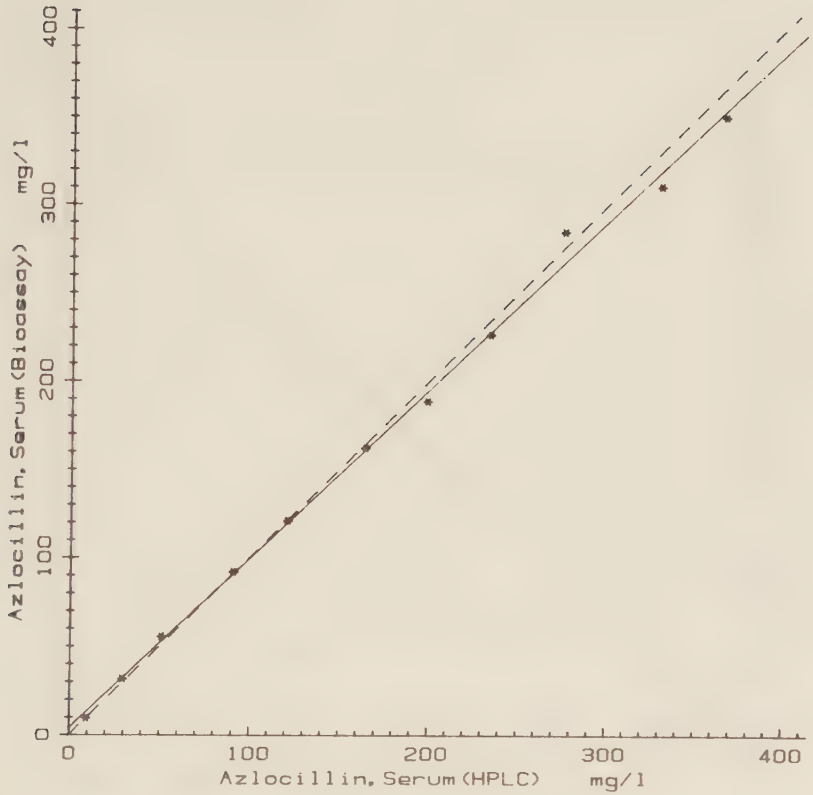


Abb. 24 Methodenvergleich: AZLOCILLIN im Serum in Gegenwart von MOXALACTAM

x = HPLC y = Bioassay

$\bar{x}$ = 171 mg/l $\bar{y}$ = 167 mg/l n = 11

$\bar{y}_{Bioassay} = 0,954 \cdot x_{HPLC} + 3,9$ mg/l

Vorzeichentest: $p > 0,05$ nicht signifikant

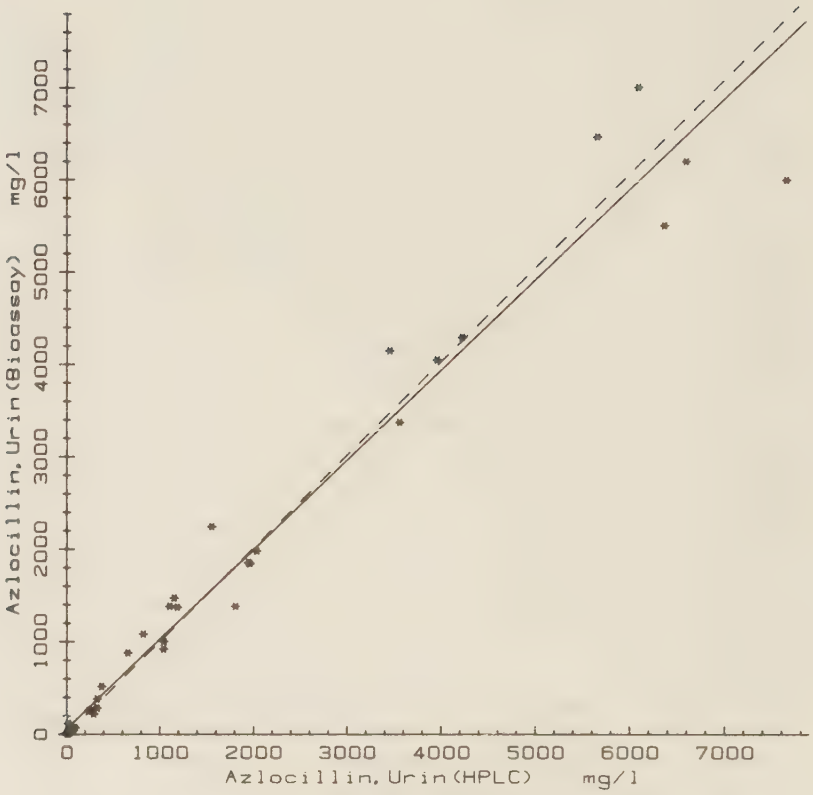


Abb. 25 Methodenvergleich : AZLOCILLIN im Urin

x = HPLC y = Bioassay

$\bar{x}$ = 1654mg/l $\bar{y}$ = 1650mg/l n = 40

$\bar{y}_{Bioassay} = 0,962 \cdot x_{HPLC} + 59,6 mg/l$

Vorzeichentest : $p > 0,1$ nicht signifikant

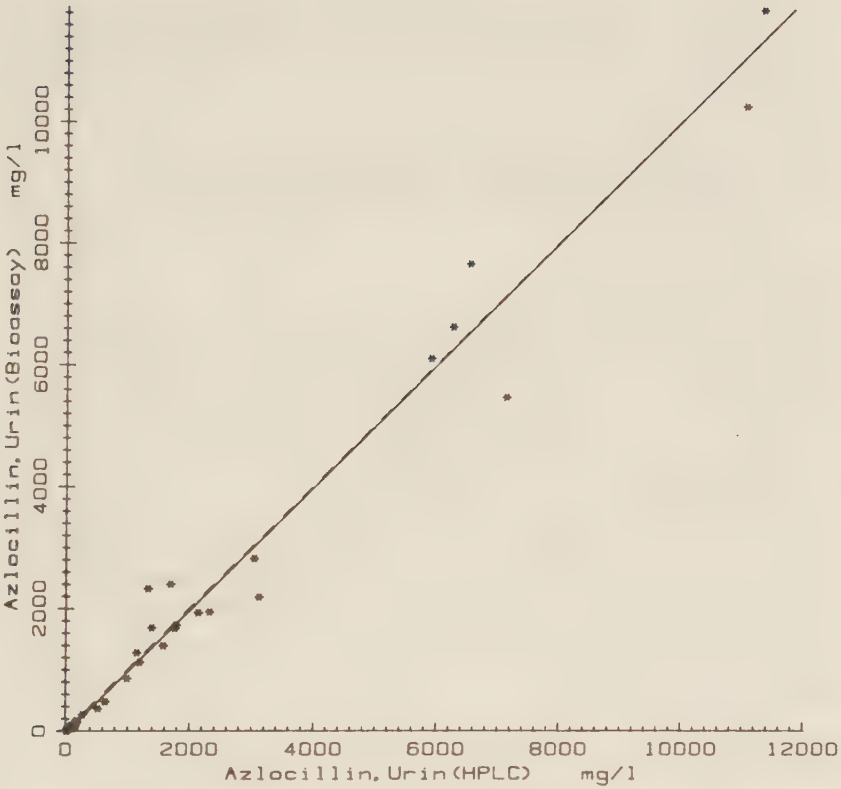


Abb. 26 Methodenvergleich : AZLOCILLIN im Urin

in Gegenwart von MOXALACTAM

x = HPLC y = Bioassay

$\bar{x}$ = 1939 mg/l $\bar{y}$ = 1912 mg/l n = 39

$\bar{y}_{Bioassay} = 1,004 \cdot x_{HPLC} - 33,7$ mg/l

Vorzeichentest : $p < 0,01$ signifikant

Es ergeben sich jedoch Hinweise für Interferenzen extrarenaler Eliminationsvorgänge. Die in den Einzeldosierungen berechneten pharmakokinetischen Parameter stimmen weitgehend mit den Ergebnissen vergleichbarer Studien überein.

4.2 Vergleich der analytischen Zuverlässigkeit und Praktikabilität von HPLC und Bioassay

4.2.1 Azlocillin

Die unteren Nachweisgrenzen lagen für Azlocillin, für die Einzelapplikation im Bioassay, mit 0,15 mg/l gegenüber 1,0 mg/l in der HPLC Methode, deutlich niedriger. Da in der Kombination mit Azlocillin ein weniger empfindlicher Keim für den Bioassay Verwendung fand, lag die untere Nachweisgrenze im Bioassay mit 1,2 mg/l etwas höher.
Der lineare Meßbereich lag für die HPLC Methode $\geq$250 mg/l, im Bioassay dagegen bis 3,125 mg/l herunter. Die Präzision in Serie (Variationskoeffizient) war in der HPLC mit 2,2 - 5,8% günstiger als der Bioassay mit 8,65%. Die Methodenvergleiche (28) zeigten in den Serumkonzentrationskurven für die Einzel- und Kombinationsdosierungen überwiegend gute Übereinstimmung. Die Ergebnisse der Urinausscheidung divergierten in der Kombination leicht (Abb. 23-26).

4.2.2 Moxalactam

Die unteren Nachweisgrenzen für Moxalactam lagen für den Bioassay mit 0,3 - 0,6 mg/l gegenüber 5 mg/l in der HPLC Methode in der Einzel- und Kombinationsapplikation deutlich niedriger. Lineare Meßbereiche fanden sich in der HPLC oberhalb 100 mg/l, im Bioassay oberhalb 50 mg/l.
Der Variationskoeffizient wurde für die HPLC von Tag zu Tag gemessen (Präzision in Serie) und lag bei 4,5 - 5,8% gegenüber 13,6% im Bioassay, die HPLC Methode bietet demnach die genaueren Ergebnisse. Der Methodenvergleich zeigte für die Serumkonzentrationen in der Kombination gute Übereinstimmung. Ebenso korrelierten die Urinausscheidungen der Einzel- wie auch der kombinierten Gabe von Moxalactam mit Azlocillin sehr gut. Die Ergebnisse der Serumkonzentrationen für die Einzelgabe von Moxalactam divergierten leicht (Abb. 27-30).

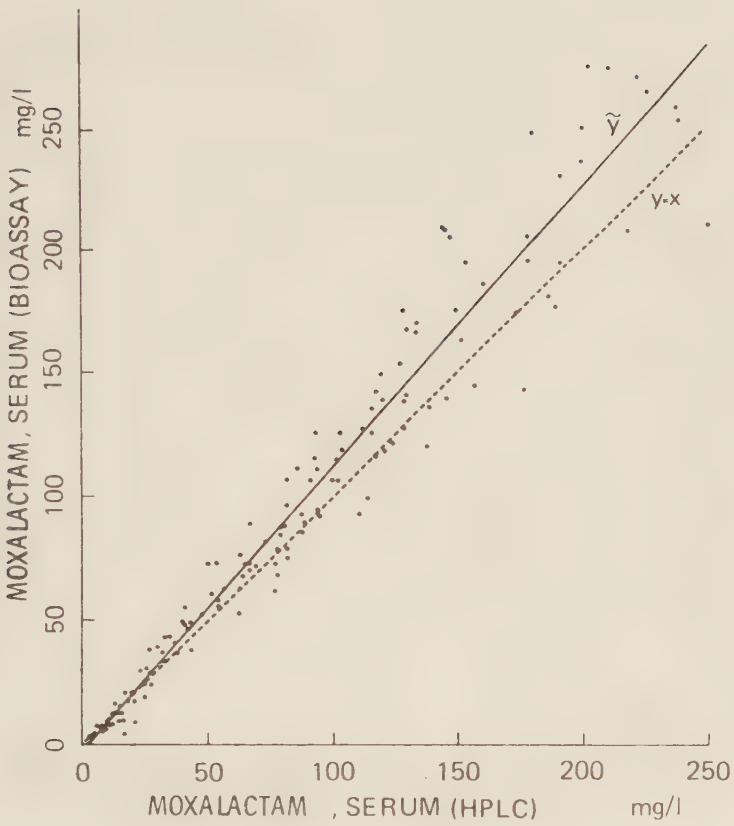


Abb. 27 Methodenvergleich: MOXALACTAM im Serum

x = HPLC y = Bioassay

$\bar{x}$ = 87,9 mg/l $\bar{y}$ = 97,5 mg/l n = 139

$\bar{y}_{Bioassay} = 1,160 \cdot x_{HPLC} - 4,45$ mg/l

Vorzeichentest: $p < 0,01$ signifikant

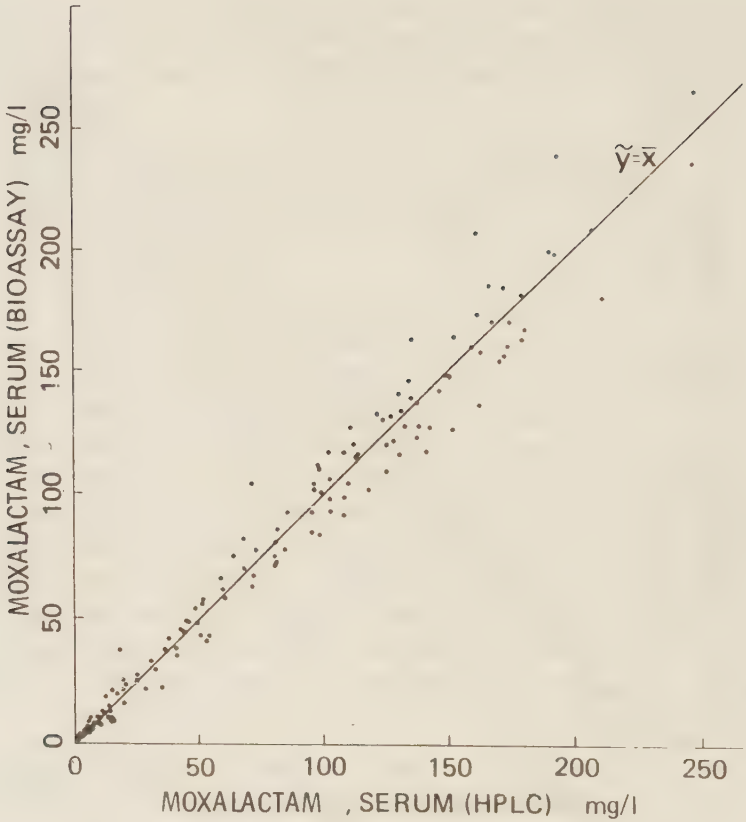


Abb. 28 Methodenvergleich : MOXALACTAM im Serum in Gegenwart von AZLOCILLIN

x = HPLC y = Bioassay

$\bar{x}$ = 85, 4mg/l $\bar{y}$ = 85, 3mg/l n = 147

$\bar{y}_{Bioassay} = 1,0 \cdot x_{HPLC}$

Vorzeichentest : $p > 0,1$ nicht signifikant

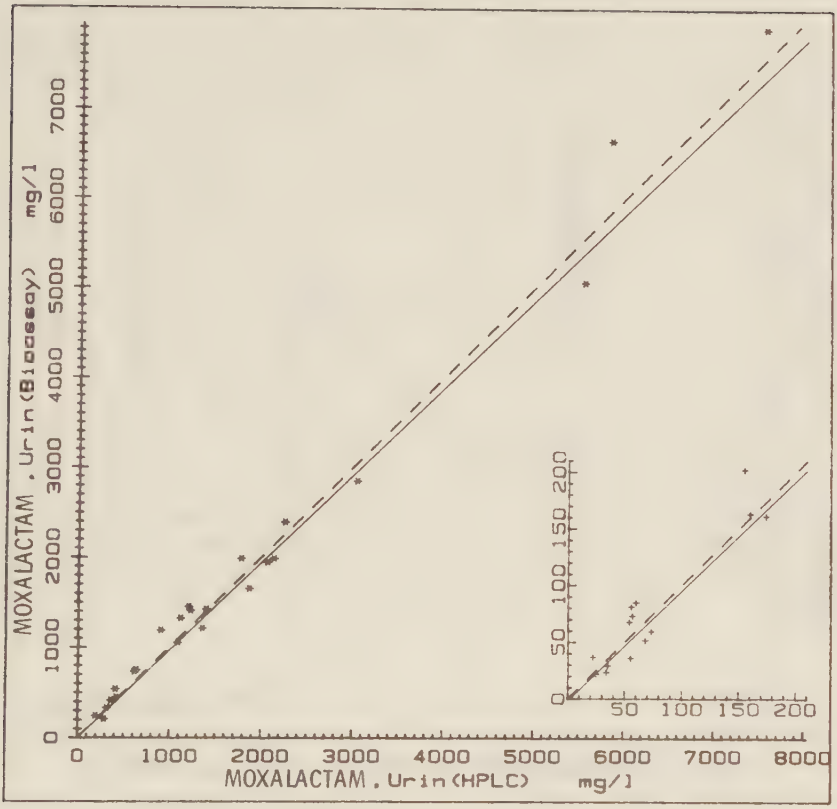


Abb. 29 Methodenvergleich: MOXALACTAM im Urin

x=HPLC y=Bioassay

$\bar{x}$ = 1215 mg/l $\bar{y}$ = 1177 mg/l n = 39

$\hat{y}_{Bioassay} = 0,970 \cdot x_{HPLC} - 1,9 mg/l$

Vorzeichentest: $p > 0,05$ nicht signifikant

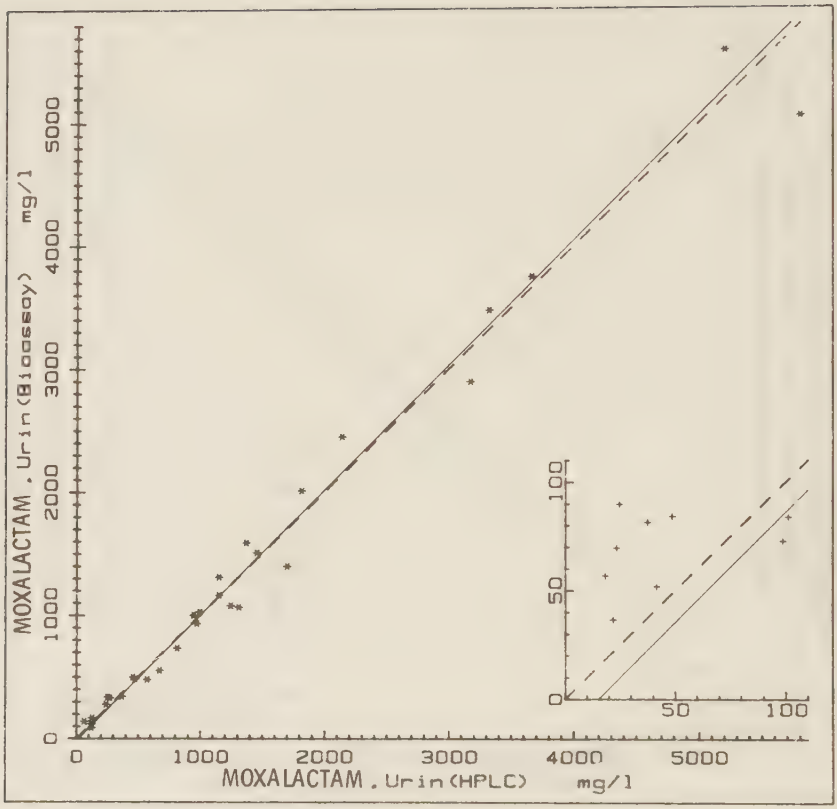


Abb.30 Methodenvergleich : MOXALACTAM im Urin in Gegenwart von AZLOCILLIN

x = HPLC y = Bioassay n = 38

$\bar{x}$ = 1089 mg/l $\bar{y}$ = 1091 mg/l

$\bar{y}_{Bioassay} = 1,016 \cdot x_{HPLC} - 15,4$ mg/l

Vorzeichentest : $p > 0,1$ nicht signifikant

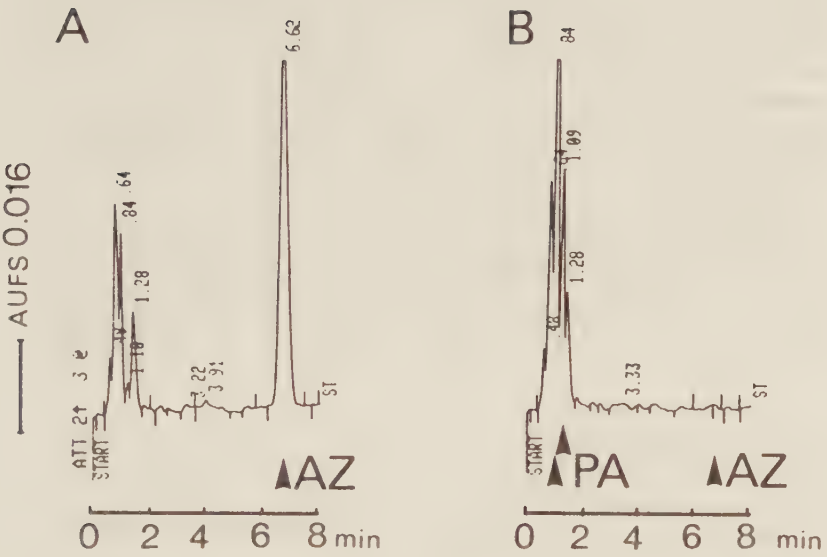


Abb.31 Enzymatische Identifikation von AZLOCILLIN durch ß-Lactamase.

AZ : AZLOCILLIN
PA : Penicilloat des AZLOCILLINs

Chromatogramm A : Serum + 250 mg/l AZLOCILLIN
Chromatogramm B : nach Abbau von Probe A mit ß-Lactamase aus Bac. cerius (II)

Für Moxalactam ist die Existenz zweier Epimere in "R" und "S" Form bekannt. WISE et al. (213) beobachteten eine Verlagerung des Gleichgewichtes zwischen "R" und "S" Form, von einem "R" - "S" Index vom Initial 0,84 auf 0,5 nach 4 h. Die "S" Form hat nach diesen Untersuchungen eine nur 50%ige antibakterielle Aktivität gegenüber der "R" Form. LÜTHY (132) belegte mit dem so vermehrten Vorliegen von "S" Epimer seine geringeren Meßergebnisse im Bioassay im Vergleich mit der HPLC-Methode. Eine derartige tendenzielle Beeinträchtigung des Bioassay konnte in unseren Untersuchungen nicht nachgewiesen werden. Im Gegensatz zum Bioassay erfordert die HPLC-Methode einen erheblich höheren apparativen und Kostenaufwand; sie arbeitet wegen der komplizierten Probenvorbereitung etwas langsamer. Dafür zeichnet sie sich für Azlocillin durch die selektive Spaltung mit β-Lactamase durch höhere Spezifität aus.

4.3 Serum-Bakterizidie

4.3.1 Allgemeine Bemerkungen zur antimikrobiellen Wirkung von β-Lactam-Antibiotika.

Die grundlegenden Eigenschaften eines Antibiotikums sind durch drei Faktoren zu beurteilen:

1. Wirkungsspektrum
2. Wirkungsintensität
3. Wirkungstyp.

ad. 1. Unter dem Wirkungsspektrum verstehen wir die Gesamtheit aller Zellen bzw. Mikroorganismen, gegen die eine Substanz in vitro abtötend oder wachstumshemmend wirkt. Das Wirkungsspektrum stellt eine entscheidende Basis-Information für die spätere klinische Anwendung eines Chemotherapeutikums dar. Die klinische Verwendbarkeit einer Substanz entspricht im wesentlichen ihrem in vitro Wirkungsspektrum. Für die antimikrobiellen Wirkstoffe läßt sich folgendes festhalten: Das in vitro Spektrum sagt nur deutlich aus, bei welchen Indikationen eine Substanz mit Sicherheit nicht verwendet werden kann, gibt aber nur einen grob orientierenden Hinweis auf die klinischen Indikationen, in denen eine Anwendung zweckmäßig oder möglich ist (44).

ad. 2. Allgemein üblich zur quantitativen Beschreibung der Wirkungsintensität dient als Meßgröße die minimale Hemmkonzentration oder MHK (MIC). Darunter ist die kleinste Konzentration eines Wirkstoffes, angegeben in mg/l, zu verstehen, die eine komplette Unterdrückung des Wachstums eines Mikroorganismus bewirkt. Die MHK eines bestimmten Wirkstoffes für einen Mikroorganismus ist keine absolute Größe. Sie ist von folgenden Parametern abhängig:

1. Größe des Inokulums
2. Zusammensetzung des verwendeten Nährbodens
3. Temperatur der Inkubation
4. pH-Wert
5. Sauerstoffspannung.

Alle diese Werte sind experimentell manipulierbar, ein MHK-Wert ist also nur dann interpretierbar, wenn die Bedingungen, unter denen er bestimmt wurde, genau bekannt sind (146). Außerdem muß ein Abgleich der mit realisierbaren Dosen noch erreichbaren Serum- bzw. Gewebespiegel mit den in vitro gefundenen Empfindlichkeiten der Keime stattfinden (44).

ad. 3. Wirkungstypen: Bakteriostase und Bakterizidie:
Für den bakteriostatischen Wirkungstyp ist die von der Wirkstoffkonzentration abhängige Verlangsamung des Bakterienwachstums bis zum völligen Wachstums- und Teilungsstillstand charakteristisch. Dieser Effekt ist reversibel. Nach Entfernung der Substanz bzw. Verdünnung des Wirkstoffes unter einen kritischen Schwellenwert (MHK) wächst die Kultur weiter (221). Nur bei längerem Wachstumsstillstand kommt es zu einer Reduktion der Zahl lebensfähiger Zellen. Wird einer Bakterienkultur in der logarithmischen Teilungsphase eine bakteriostatisch wirksame Substanz zugegeben, so verlängert sich konzentrationsabhängig die Generationszeit der Bakterien. Unterhalb der Konzentration, bei der völliger Stillstand des Wachstums eintritt, ist die Gesamtzahl der in der gehemmten Kultur vorhandenen Zellen charakteristischerweise mit der Zahl der teilungsfähigen Zellen identisch. Erst bei Stillstand des Wachstums gehen Gesamtzellzahl und Anzahl der lebensfähigen Zellen auseinander (62).

Im Gegensatz dazu bewirken bakterizide Substanzen in Abhängigkeit von der Wirkstoffkonzentration eine irreversible Schädigung der Bakerien. Bereits bei Wirkstoffkonzentrationen, die noch unterhalb der MHK liegen, ist die Zahl der noch lebensfähigen Keime in der Kultur deutlich kleiner als die Gesamtzahl. Im Bereich der MHK, maximal aber bei dem zwei- bis vierfachen dieser Konzentrationen werden alle Keime einer Kultur innerhalb kurzer Zeit abgetötet (61, 63).

β-Lactamantibiotika töten nur in Teilung befindliche Bakterien ab. Man spricht deshalb besser von einem degenerativ-bakteriziden Wirkungstyp. Therapeutisch ist die bakterizide Wirkung der bakteriostatischen vorzuziehen. Dafür sprechen in erster Linie zwei Gesichtspunkte:

I. Eine Wachstumshemmung (Bakteriostase) muß konsequent über jene Zeiträume aufrechterhalten werden, die zur Elimination der im Organismus befindlichen Bakterien durch körpereigene Abwehrkräfte ausreichen. Jede auch nur kurzfristige Senkung der Blut- und Gewebekonzentration unter die in vivo geltenden minimalen Hemmkonzentrationen (MHK), kann zur Wiederaufnahme der bakteriellen Proliferation und damit zu einer Vermehrung der in den Organismus eingedrungenen Keime führen. Auch für bakterizide Verbindungen ist eine möglichst konstante Aufrechterhaltung wirksamer Blut- und Gewebekonzentrationen wünschenswert (44, 99).
Ein vorübergehender Abfall der Wirkstoffspiegel kann dabei eher in Kauf genommen werden, als bei rein bakteriostatischen Verbindungen. Modellversuche in vitro haben gezeigt, daß nach der Entfernung eines bakteriziden Antibiotikums aus einer Bakterienkultur einige Stunden vergehen, bis die überlebenden Keime wieder anfangen sich zu teilen (222). Die Gefahr, daß eine nicht voll adäquate Dosierung zu einem Rezidiv führt, ist bei bakteriziden Substanzen geringer zu veranschlagen als bei nur bakteriostatisch wirksamen Verbindungen (44).

II. Bakteriostatisch wirkende Substanzen können lediglich das Wachstum bzw. die Teilung infizierender Keime hemmen. Sie haben keine abtötende Wirkung und reduzieren daher die Zahl der bereits im Organismus befindlichen Keime nicht. Die Elimination der durch

eine bakteriostatische Substanz gehemmten Keime muß ausschließlich durch humorale oder zelluläre Abwehrmechanismen des Organismus erfolgen (6). Mit einer bakteriziden Therapie wird dagegen sofort eine Reduktion der Keimzahl erreicht. Die körpereigenen Abwehrmechanismen spielen dabei zwar eine wichtige unterstützende, aber keine so unerläßliche Rolle wie bei einer bakteriostatischen Behandlung (44).

Aus diesen Überlegungen folgt, daß Infektionen bei immunologisch kompromittierten Patienten (nach Bestrahlung, Cytostatikabehandlung oder bei malignen Systemerkrankungen) nach Möglichkeit mit bakteriziden Substanzen behandelt werden sollten (177, 106, 9).

Bei der den β-Lactam-Antibiotika zugeschriebenen degenerativen Bakterizidie (59) können jedoch in der angegriffenen Bakterienkultur sogenannte Persister verbleiben, die in der proliferierenden Kultur nicht abgetötet werden. Diese Tatsache ergibt sich aus dem Umstand, daß in einer Kultur von Bakterien nicht alle Keime sich in einem synchronen Stoffwechselzustand befinden. Diese nicht proliferierenden Keime sind in dieser Phase unempfindlich, nicht aber resistent. Sie können sich in einer mehrstündigen Erholungsphase in Abwesenheit des Antibiotikums erneut vermehren (203). Nicht zuletzt muß darauf hingewiesen werden, daß die Interaktionen zwischen Wirkstoff und Mikroorganismus in vivo unter Bedingungen stattfinden, wie sie laborchemisch nicht vorliegen. So gehen wir z.B. in unseren Untersuchungen jeweils von Keimzahlen aus, die relativ klein sind, in unserem Fall von $0{,}5 \times 10^6$ Keime/ml. In dieser Größenordnung findet also stets spontanes Wachstum der Erreger statt. Dagegen können im Organismus, z.B. in einem abgekapselten Infektionsherd zum Zeitpunkt des Einwirkens eines Antibiotikums die Keimzahlen bereits so hoch sein, daß die Teilungsrate im Vergleich zu unseren in vitro Bedingungen niedriger ist (44). Ebenso bieten sich in Körperflüssigkeiten oft völlig andere Voraussetzungen bezüglich der Wirkungsentfaltung von Antibiotika (180), insbesondere zu berücksichtigen sind hier die Faktoren Eiweißbindung (117, 155), Komplement, konstante O_2 Spannung während des gesamten Untersuchungszeitraumes sowie Ernährungsbedingungen (44, 116).

Für andere Infektionsorte als den Blutkreislauf bei Sepsis, sollten z.B. Bronchialsekrete oder Urinsammlungen für Untersuchungen der Bakterizidie verwendet werden (105).

Wirkungsmechanismus der β-Lactame

Aufbau der Bakterienzellwand und Interaktion mit β-Lactam-Antibiotika:

Die Wirkung von β-Lactam-Antibiotika auf die Zellwandsynthese der Bakterien ist in den vergangenen Jahren intensiv untersucht worden und gilt heute als weitgehend aufgeklärt. Das sogenannte Murein, ein Peptidoglycan, stellt das Grundgerüst der Zellwand dar und umgibt als in sich geschlossenes Makromolekül die Zelle. Die Bausteine sind zwei Aminozucker (N-Acetylmureinsäure und N-Acetylglucosamin) sowie mehrere Aminosäuren. Die Synthese des Mureins verläuft in mehreren Teilschritten. Durch Aneinanderreihung der niedermolekularen Bausteine wird in der Bakterienzelle zunächst ein lineares Polymer gebildet, das im letzten Schritt außerhalb der Zytoplasmamembran (im sogenannten Periplasmatischen Raum) vernetzt wird, wodurch das Murein seine Festigkeit und Starrheit erhält (151). Diese Vernetzung wird durch β-Lactam-Antibiotika verhindert. Zwischen den einzelnen Bakterienspezies bestehen Unterschiede im Mureinaufbau. Sie beziehen sich vor allem auf die Zusammensetzung der Peptidkette (63). Außerdem liegt der Mureingehalt in den Zellwänden grampositiver Bakterien um ca. das 10fache über dem von gramnegativen Keimen. Bei grampositiven Keimen besitzt das Murein eine monomolekulare Struktur. Es liegen bis zu 25 Mureinschichten übereinander (44). Der Aufbau gramnegativer Zellwände ist komplexer:
Der Murein-Sacculus beträgt hier nur etwa 12% des Trockengewichts der Zellwand und ist im Gegensatz zur grampositiven Zelle einschichtig. Schematisch ist der Aufbau der Zellwand bei einem gramnegativen Bakterium in Abb. 32 dargestellt.
Die Zytoplasmamembran grenzt das Zytoplasma nach außen ab und bildet gleichzeitig die innere Begrenzung des sogenannten periplasmatischen Raumes. Nach außen wird dieser Raum von der äußeren Membran begrenzt, die ebenso wie die Zytoplasmamembran eine Doppelschicht darstellt. Zwischen diesen beiden Membranen, aber näher zur inneren Membrane befinden sich der einschichtige Murein-Sacculus. Elongierte Lipoproteinmoleküle sind kovalent

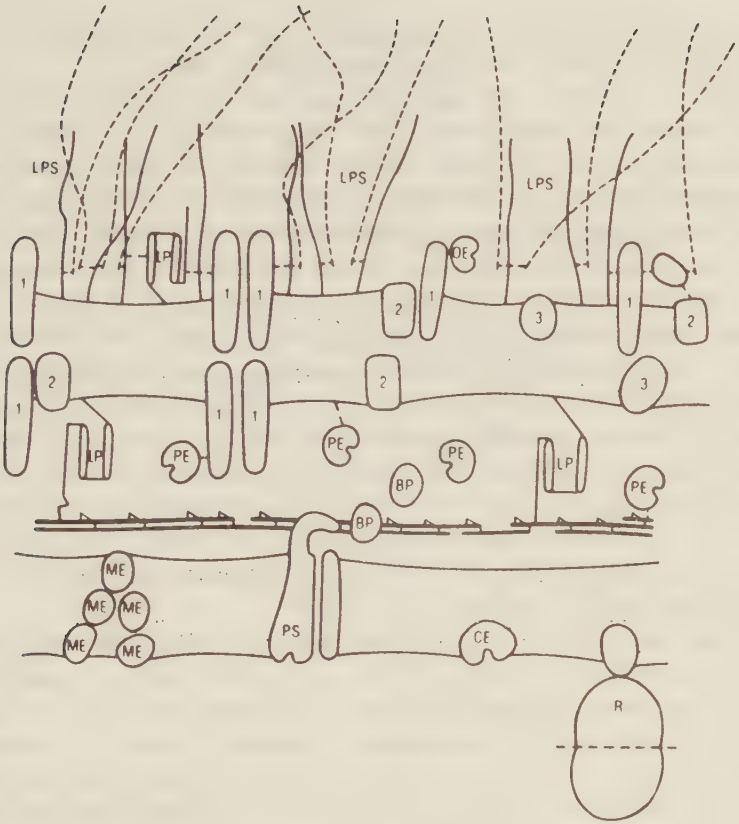


Abb. 32 Aufbau der Zellwand eines gramnegativen Bakteriums. 1, 2, 3= Proteine der äußeren Membran, LPS= Lipopolysaccharid, OE= an der Zelloberfläche lokalisiertes Enzym, LP= Braunsches Lipoprotein, PE= periplasmatisches Enzym, BP= Bindungsprotein, ME= Membranenzym, beteiligt an der Synthese von Zelloberflächenstrukturen, PS= Permease, CE= Membranenzym mit zytoplasmatisch orientierter Funktion, R= Ribosom (aus: Costerton, J. W., in: Microbiology 1977 (Schlessinger, D. ed.) Washington D. C. Am. Soc. Microbiology)

mit der Peptidoglykanschicht verbunden und ragen mit ihren Lipidanteilen bis in die hydrophobe Schicht der äußeren Membran (62).
Die "sperrige" Struktur des Peptidoglykanlipoprotein-Komplexes trägt zur Erhaltung des periplasmatischen Raumes bei und besitzt selbst einen nennenswerten Anteil dieses Raumes. Im periplasmatischen Raum befinden sich außerdem Enzyme, die von außen eindringende Stoffe abbauen. Auch Antibiotika inaktivierende Enzyme wie β-Lactamasen sind in diesem Zellkompartiment lokalisiert (199). Die äußere Membran stellt für den Stoffaustausch zwischen der Umgebung der Zelle und dem periplasmatischen Raum eine im wesentlichen hydrophobe Barriere dar. Sie besteht aus Lipiden, Phospholipiden, Lipopolysacheriden und Proteinen. Gemäß den z.Z. akzeptierten Vorstellungen, ordnen sich Phosphalipide und Lipopolysacheride in ihr dergestalt an, daß die hydrophoben Anteile dieser Moleküle sich in das Membraninnere orientieren, während die hydrophilen Gruppen, z.B. die Polysaccharidketten der Lipopolysaccharide, nach außen gerichtet sind (44, 62, 63, 151). Die äußere Membran vieler gramnegativer Bakterien ist relativ durchlässig. Moleküle von der Größe eines Tetrapeptids, wie z.B. β-Lactame können sie passieren.
Die Angriffspunkte der Penicilline bzw. Cephalosporine liegen in der letzten Stufe der Murein-Synthese. Sie reagieren mit der Murein-Transpeptidase die die Quervernetzung vermittelt. Unter Aufspaltung des β-Lactamringes und Ausbildung einer kovalenten Bindung, entsteht ein Penicilloyl-Enzym-Komplex, der eine irreversible Inaktivierung der Transpeptidase zur Folge hat (59). Penicillin fungiert hierbei als Strukturanalogon zum terminalen D-Alanyl-D-Alanin der Pentapeptidkette, dem Substrat der Transpepdidase. Die C-N-Bindung des β-Lactamringes entspricht der Peptidbindung im Dipeptid. Neben den Transpeptidasen gibt es weitere penicillinempfindliche Enzymsysteme in Bakterienzellen, z.B. Carboxypeptidasen und Endopeptidasen. Die in den vergangenen Jahren besonders intensiv untersuchten Carboxypeptidasen spalten, wie die Transpeptidasen, das terminale D-Alanyl-D-Alanin von der Peptidkette ab, ohne eine gleichzeitige Quervernetzung zu katalysieren. Es wird vermutet, daß dieses Enzym das "cross-linking" reguliert (59). Bakterien mit hohem Grad der Vernetzung, wie z.B. Staphylokokken, verfügen nicht über eine solche Enzymaktivität. Spratt (193) bestimmte 1980 mittels Gelelektrophorese mindestens 7 verschiedene Angriffspunkte für β-Lactam-Antibiotika an der inneren Zytoplasmamembran. Diese Penicillin bindenden Proteine (PBP's) stellen die Rezeptoren für die Substanz-

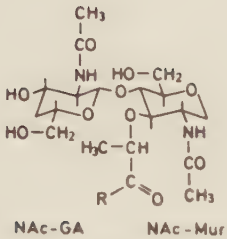


Abb.33 Chemische Struktur des Disaccharidanteils im Murein.

NAc-GA = N-Acetylglucosamin
NAc- Mur = N-Acetylmuraminsäure
R = Peptidkette

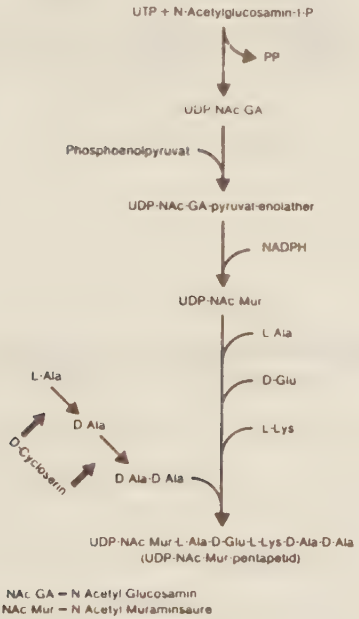


Abb.34 Mureinsynthese bei Staphylokokken.
1. Stufe: Bildung von UDP-N-Acetylmuramylpentapeptid
(Anlehnung an Blumberg, P. M., u. J. L. Strominger, Bacteriol. Rev. 38, 291, 1974)

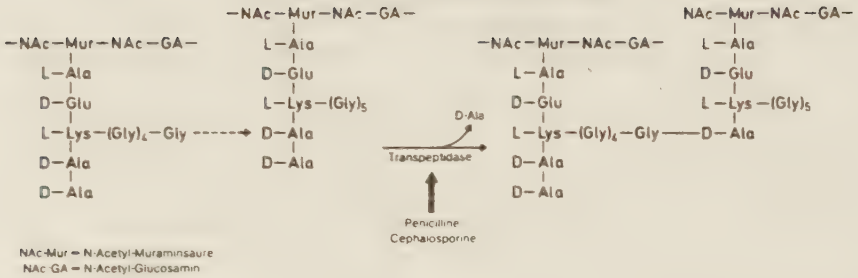


Abb. 35 Mureinsynthese bei Staphylokokken.
Quervernetzung zweier linearer Glycopeptidketten

Abb. 36 Vereinfachte Darstellung der Peptidoglycanschicht von E. coli.
Die Glycanketten sind aus N-Acetylglucosamin (G) und N-Acetylmuraminsäure (M) zusammengesetzt. Die vertikalen Linien bei den N-Acetylmuraminsäureresten bedeuten das Pentapeptid-L-Ala-D-Glu-R-D-Ala-D-Ala. Die horizontalen Linien stellen zwei mit direkter Peptidbindung verknüpfte Tetrapeptide dar. R = L-Lysin, L-Ornithin oder meso-Diaminopimelinsäure.

gruppen der Penicilline und Cephalosporine dar. Das genaue Wirkungsmuster, d.h. das Spektrum der so blockierten Enzymsysteme läßt sich mittels Verdrängung von markiertem Benzylpenicillin durch das zu untersuchende Antibiotikum am Rezeptor bestimmen (193). Es wird heute davon ausgegangen, daß neben den oben genannten Enzymsystemen ca. 30 verschiedene Fermente an der Vernetzung der Bakterienwand mitwirken. Antibiotika, die das PBP 1 blockieren, induzieren eine Lyse der Zelle da PBP 1 am Längenwachstum der Bakterien beteiligt ist. Dieser Angriffspunkt scheint für E. coli ein wesentlicher Faktor bei der Hemmung des Keimwachstums zu sein. Blockierungen am PBP 2 haben osmotische Rundformen zur Folge. Die Bindung am PBP 3 führt zur Ausbildung von filamentförmigen Bakterienzellen. Für PBP 4, 5 und 6 sind bisher keine spezifischen Wachstumsveränderungen bekannt geworden.

4.3.2 Struktur - Wirkungsbeziehungen

Die sterisch chemische Struktur eines β-Lactam-Antibiotikums beeinflußt in entscheidendem Maße die Pharmakodynamik einer Substanz. Um an den eigentlichen Wirkort, bzw. Rezeptor an der Bakterienmembran zu gelangen, muß die Substanz zunächst in ausreichender Menge durch die Bakterienzellwand diffundieren können. Dazu ist eine gewisse ionische Ladungsverteilung nötig. Dabei scheint nach bisherigen Untersuchungen keine einseitig lipophile oder hydrophile Seitengruppe verantwortlich zu sein (195). Von den Cephalosporinen wurde im allgemeinen jedoch ein besseres Penetrationsvermögen als von den Penicillinen beschrieben. Am Wirkort sollen die β-Lactam-Antibiotika eine möglichst ausgeprägte Reaktivität mit der Transpeptidase zeigen. Die Ringspannung des β-Lactam-Ringes ist hierfür der chemische Parameter.
Nach GORMAN und RYAN (75) verfügen Penicilline über eine höhere Ringspannung als die Cephalosporine. Andere Untersucher, wie SASSIVER und LEWIS (175) stellten fest, wie die Verschiebung von Doppelbindungen innerhalb des Ringsystems zu einer völligen Wirkungseinbuße auf Grund zu hoher Stabilität der chemischen Struktur führen kann. Die Substituenten am Grundgerüst der β-Lactam-Antibiotika wiederum konnten zur Modifikation des Wirkungsspektrums sowie der Pharmakokinetik der Substanz in weiten Bereichen variiert werden. So wirkten sich beispielsweise Veränderungen am C 7-Rest vorwiegend auf die Pharmakokinetik, Variationen am C 3-Rest mit z.B. elektronenziehenden Substituenten auf die Wirksamkeit gegen gramnegative

Keime aus (75). Beim Azlocillin befindet sich am C 3-Rest eine Carboxylgruppe, beim Moxalactam substituiert hier ein Tetrazolring. Die strukturelle Verschiedenheit schlägt sich bei beiden Substanzen im Keimspektrum nieder. Der Wirkungseintritt der Cephalosporine sowie der Penicilline ist weiterhin durch enzymatische Spaltung des β-Lactam-Ringes durch spezifische β-Lactamasen gefährdet. Diese Gruppe von Enzymen befindet sich bei den grampositiven Bakterien in der direkten Umgebung des Mureingerüstes. Sie werden an der inneren Zytoplasmamembran produziert und diffundieren von dort durch das Mureingerüst hindurch in das umgebende Medium (199). Gramnegative Bakterien inaktivieren durch β-Lactamasen, die sich im periplasmatischen Raum entsprechend der Abb. 32 befinden. Sie inaktivieren also nicht durch Diffusion in die Umgebung des Keimes sondern sind zellgebunden. Diese Enzyme wurden 1973 von RICHMOND und SYKES (161) in fünf Klassen eingeteilt, die mit römischen Ziffern bezeichnet wurden. Neuerliche Untersuchungen ergaben, daß sie in ihrer Produktion induzierbar sind (83, 173) und zwar spezifisch für ihr Substrat. Es liegt der Schluß nahe, daß gerade solche Substanzen, die besonders stabil gegen β-Lactamasen sind, deren Produktion besonders induzieren (173).

4.3.2.1 Azlocillin

Das Azlocillin entstammt der Gruppe der Acylureidopenicilline; es ist ein Abkömmling des Ampicillins bei dem eine Aminogruppe der Seitenkette substituiert wurde. Pharmakologischer Vorläufer war das Carbenicillin, das im Vergleich zum Ampicillin besondere Wirksamkeit gegen Pseudomonas spezies bietet. Allerdings werden zum Erreichen eines ausreichenden Wirkstoffspiegels im Serum sehr hohe Dosen gebraucht (10, 11, 94), unter denen Komplikationen beobachtet wurden.
Azlocillin wird parenteral appliziert, intramuskuläre Applikation ist möglich, aber schmerzhaft und ergibt geringere Serumspitzenwerte als die intravenöse Injektion. Bei schweren Infektionen mit schwach empfindlichen Erregern, ist eine Dosierung von 3 x 5 g/die als Kurz- oder Bolusinjektion angezeigt.
Die Plasmaeiweißbindung liegt bei ca. 30% (181, 187), die Wiederfindung im Urin beträgt nach 24 Stunden zwischen 55 und 65% (127). Ca. 6% der applizierten Substanz werden als antibakteriell unwirksames Penicilloat mit dem Harn ausgeschieden (66).

Darüber hinaus wird Azlocillin in erheblichem Maße biliär ausgeschieden. Antibakteriell wirksame Spiegel wurden von DÜBEN et al. (45) für ca. 12 h nach Applikation von 2 g Azlocillin für die häufigsten Erreger der Gallenwegsinfektionen (E. coli, Enterokokken, Klebsiellen, Proteus sp.) gefunden. Das Wirkungsspektrum des Azlocillins ist im Vergleich zum Carbenicillin 4-8fach gesteigert (14, 187), Enterokokken werden etwa 10fach besser erfaßt, Keime der Bacteroides-Gruppe ca. 2fach besser. Die minimalen Hemmkonzentrationen gegen Pseudomonas Spezies wurden mit 4-8 mg/l angegeben (181, 187) jedoch wurden erst bei Konzentrationen von ca. 64 mg/l 75% der Keime abgetötet (113). Bei mäßiger Empfindlichkeit gegenüber Carbenicillin und Gentamycin liegt die MHK insgesamt im Bereich zwischen 32 und 64 mg/l (14, 35, 181). Penicillinase bildende Stämme sowie der größte Teil der Enterobacter und Serratia spezies sind unempfindlich. Mit Ticarcillin, Mezlocillin sowie Ampicillin sind unvollständige Kreuzresistenzen bekannt. Die Indikationsstellung zur Anwendung von Azlocillin ist bei vermuteten oder nachgewiesenen Pseudomonas-Infektionen gegeben, wie z.B. bei Pneumonien bei Beatmung, Erythema gangränosum, sekundär infizierten Verbrennungswunden, Septikämien bei Leukosen oder Aspirationspneumonien. Für die Therapie von schweren Infektionen bei abwehrschwächenden Grunderkrankungen sind außerdem Kombinationen mit Aminoglycosiden wie z.B. Gentamicin (39, 40) oder bei ungezielter Therapie mit einem /3-lactamasestabilen Cephalosporin oder Isooxazolyl-Penicillin (113) als erfolgreich beschrieben worden.

4.3.2.2 Moxalactam

In der Gruppe der Cephalosporine unterscheidet man zwischen den klassischen parenteralen Cephalosporinen (Cefaloridin, Cefalotin, Cefazolin, Cefacetril und Cefapirin) und den besser /3-lactamasestabilen Cephalosporinen (Cefamandol, Cefoxitin, Cefuroxim), den Pseudomonas wirksamen Cephalosporinen (Ceftazidim und Cefsulodin) und den fast völlig /3-lactamasefesten neuen parenteralen Cephalosporinen (Cefotaxim, Ceftizoxim, Cefoperazon und Ceftriaxon). Daneben steht die Gruppe der oral appl. Cephalosporine (Cefalexin, Cefradin, Cefaclor, Cefadroxil, Cefatrizin). Moxalactam - wie Cephamycin - vereint durch seine chemische Struktur die Eigenschaften der parenteralen /3-lactamasestabilen- und der Bact. fragilis-wirksamen Cephalosporine in sich.

Die Substanz wurde 1976 im Shionogi Research Laboratory (150) entwickelt. Der Ersatz des Schwefelatoms in der Ringstruktur läßt keine Kreuzresistenz mit Penicillinen wie mit anderen Cephalosporinen wirksam werden. Im chemischen Aufbau ist die Struktur dem Cefoxitin vergleichbar (211). Das antibakterielle Spektrum ähnelt mehr dem Cefotaxim, jedoch ist die Wirksamkeit gegenüber Bacteroides Spezies gesteigert (210).

Die erreichbaren Serumspiegel des Moxalactam sind höher als die des Cefotaxims, was WISE, BAKER und LIVINGSTON (210) zum Teil mit unterschiedlichen Verteilungsvolumina der Substanzen (ca. doppelter Verteilungsraum des Cefotaxims) erklärten.

Die Serumhalbwertszeit liegt bei Moxalactam ca. doppelt so hoch wie die des Cefotaxims. Das antimikrobielle Wirkungsspektrum erfaßt im einzelnen bei den grampositiven Bakterien die penicillinempfindlichen und die unempfindlichen Staphylokokken, Streptokokken mit Ausnahme der Enterokokken (speziell Streptococcus faecalis), bei den gramnegativen Bakterien E. coli Klebsiella Spezies, Proteus Spezies, Hämophilus influenza, Serratia, Enterobacter Spezies, Salmonella Spezies, Providencia Spezies, Shigellen Spezies, Neisseria gonorrhoe, Neisseria meningitidis sowie in hoher Dosierung Pseudomonas Spezies. Außerdem werden zahlreiche anaerobe Keime wie z.B. Clostridium perfringens und Bacteroides Spezies erfaßt (29, 42, 58, 93, 134, 137, 188, 209). Vergleichende Untersuchungen des Wirkungsspektrums mit Cefotaxim und Cefoperazon gegen grampositive sowie gramnegative Erreger ergaben allerdings eine relativ schwächere Aktivität von Moxalactam gegen die wichtigsten grampositiven Kokkenarten speziell gegen Staphylokokken (158). Ebenso weist Moxalactam gegenüber /3-hämolysierenden Streptokokken der Gruppen A und B sowie bei den Pneumokokken eine etwas geringere Aktivität als die genannten Vergleichspräparate auf. Die Wirkung im gramnegativen Bereich liegt bei Pseudomonas Spezies zwischen Cefotaxim und Cefoperazon (158).

Moxalactam liegt im Serum zu ca. 40% an Protein gebunden vor (9). Die Wiederfindung im Urin beträgt in 24 Stunden ca. 87% (211).

WISE et al. berichteten 1981 von zwei Epimeren des Moxalactams, der "R" und der "S" Form (213). Beide Epimere stehen in einem Lösungsgleichgewicht von 45% "R" Form zu 55% "S" Form im Serum.

Die selektive Messung der MHK-Werte der beiden Epimere erbrachte nach WISE eine höhere Aktivität des "R" Epimeres von maximal einer Titerstufe bei 15 von 23 Stämmen grampositiven und gramnegativen Bakterien (213).

Die therapeutischen Auswirkungen dieser Beobachtungen an einem sehr begrenzten Stichprobenumfang, dürften in Anbetracht des Vorliegens eines chemischen Gleichgewichtes in vivo in Grenzen bleiben. Die erreichbaren Konzentrationen von Moxalactam in den Körpergeweben von Knochen und Adnexen sowie in Wundsekret, Peritonealexsudat und der Gallenexkretion lassen einen Einsatz bei empfindlichen Erregern sinnvoll erscheinen (214). Durch seine Liquorgängigkeit ist speziell die durch Enterobakterien verursachte Meningitis therapeutisch beeinflußbar (95).

4.3.3 Mikrobiologie

Die sechs in dieser Untersuchung beobachteten Keimspezies wurden kurz vor Versuchsbeginn klinisch frisch isoliert, für die Versuche 1, 2 und 3 wurden jeweils dieselben Bakterienstämme benutzt. Es handelte sich hier um 4 Keimspezies der Familie der Enterobacteriaceae sowie um einen Stamm Streptococcus faecalis und einen Stamm Pseudomonas aeruginosa. Es sollte damit ein Spektrum von Keimen vertreten sein, die häufige Erreger von z.B. Harnwegsinfektionen oder Pneumonien sowie Mischinfektionen etc. darstellen. Die Ausbreitung fakultativ pathogener Enterobacteriaceae sowie von Pseudomonas bei stark vorgeschädigten und schwerkranken Patienten z.B. auf Intensivstationen, führt nicht selten zu nosokomialen Infektionen, die bei Vorliegen multiresistenter Klebsiella-, Enterobacter- und anderer Stämme, vor allem wegen der oft erfolglosen antibiotischen Therapie sehr schwer verlaufen können.

4.3.3.1 Enterobacteriaceae

Die Enterobacteriaceae sind 2 - 3µ lange, teils bewegliche und peritrich begeißelte, teils unbewegliche, sporenlose gramnegative Stäbchen, die Glukose und andere Kohlenhydrate unter Säurebildung oder Gasbildung vergären. Sie sind fakultative Anaerobier und auf den üblichen Nährböden leicht züchtbar. Da sie mikroskopisch nicht zu unterscheiden sind, dienen zur Klassifizierung vorwiegend biochemische Merkmale. Innerhalb der einzelnen Gattungen und Spezies ist darüber hinaus noch eine Unterteilung auf Grund der Antigenstruktur, bei den Salmonellen z.B. nach dem KAUFFMANN WHITE Schema (26, 151) möglich.

4.3.3.2 Escherichia coli

Escherichia coli (E. coli) gehört zu den Enterobakteriaceae und ist, wie alle Arten dieser Gruppe, ein stäbchenförmiges gramnegatives Bakterium mit der Fähigkeit, Glukose abzubauen und Nitrate zu Nitriten zu reduzieren. Natürlicher Standort ist der Dickdarm des Menschen und vieler Säugetiere, wo es in Keimzahlen von 10^7 - 10^9 Keime pro Gramm feuchte Stuhlmasse vorkommt.

Bei E. coli lassen sich drei charakteristische Antigengruppen unterscheiden (37): O-Antigene: Sie sind integrierter Bestandteil der Zellwand und werden deshalb auch als "somatische Antigene" bezeichnet.

Chemische Struktur: Lipopolysaccharide.

Diese Substanz in gereinigter Form wird wegen ihrer vielfältigen biologischen Wirkungen auch als Endotoxin bezeichnet. Rund 150 verschiedene O-Typen sind klassifiziert.

K-Antigene: Sie sind Bestandteil der Kapsel oder einer hüllenähnlichen Struktur: Meist saure Polysaccharide.

H-Antigene: Sie sind als Strukturproteine in den Geißeln lokalisiert.

Anzahl : 52,7 - 80% aller E. coli-Stämme sind begeißelt. Typisch ist die peritriche Begeißelung, d.h. die Geißeln finden sich über die gesamte Bakterienzelle verteilt.

E. coli ist ein typisches Beispiel für ein fakultativ pathogenes Bakterium. Mit Ausnahme einiger "Dyspepsie-coli"-Typen und Stämme mit der Fähigkeit zur Enterotoxinbildung ist E. coli nur außerhalb des Intestinaltraktes von pathogener Wirkung (151).

Häufigste Lokalisation von Escherichia-coli-Infektionen sind die ableitenden Harnwege, bei denen E. coli in 60 bis 90% aller Fälle isoliert wird. Sonst findet man ihn als Erreger von Bakteriämie, Meningitis, Peritonitis (meist als Mischinfektion), Cholangitis, Cholecystitis, Wundinfektionen u.a.m. (183). Bestimmte serologisch definierte Stämme, sog. Dyspepsie-coli-Serotypen, können bei Säuglingen und Kleinkindern zu einer Enteritis mit hoher Infektiosität führen (15). Die klinische Bedeutung dieser Infektionen scheint allerdings rückläufig zu sein. Von zunehmendem Interesse sind hingegen E.-coli-Stämme mit der Fähigkeit zur Bildung eines Exotoxins, das dem Cholera-Toxin sehr ähnlich ist und wegen seiner Wirkung als Enterotoxin bezeichnet wird. Solche Stämme können, vorzugsweise in warmen Ländern, sehr intensive Diarrhöen ("travellers disease")

auslösen (37).
Die Fähigkeit der Enterotoxinproduktion und somit der Enteropathogenität muß dabei nicht mit bestimmten serologisch definierten Typen zusammenhängen. Routinemäßig durchführbare Teste der Enterotoxinproduktion sind noch in Entwicklung. In jüngster Zeit hat sich gezeigt, daß E.-coli-Stämme, die bei der bakteriellen Meningitis von Kindern gefunden werden, sehr häufig das K-Antigen K 1 besitzen, das sehr eng verwandt ist mit den Kapsel-Antigen von N.meningitidis, Gruppe B (37). Im allgemeinen lassen sich E.-coli-Infektionen chemotherapeutisch gut behandeln. Gelegentlich bedeuten im Hospitalmilieu selektierte hochresistente Stämme große therapeutische Probleme.

4.3.3.3 Klebsiella oxytoca

Klebsiellen sind eine Gattung innerhalb der Gruppe der Enterobacteriaceae, die drei Spezies umfaßt: Klebsiella pneumoniae, Klebsiella rhinoscleromatis und Klebsiella ozaenae.
Natürlicher Standort ist der Dickdarm des Menschen, höherer Säugetiere und bemerkenswerterweise der Darm bestimmter Insektenarten. Einige Stämme besitzen eine besondere Affinität zu den Atemwegen (151).
Charakteristischerweise sind Klebsiellen-Stämme unbegeißelt, also unbeweglich und haben eine gut ausgebildete Kapsel. Ihre Antigenstruktur läßt 5 O-Antigene und 72 Kapsel-Antigene unterscheiden. Letztere sind saure Polysaccharide und gestatten eine serologische Typisierung, meist mittels Kapselschwellungsreaktion (223).
Typische Infektlokalisationen durch Klebsiellen sind Atemwegsinfektionen, Pneumonien und Harnwegsinfektionen. In letzter Zeit werden Klebsiellen-Stämme auch als Erreger von Meningitiden und Septikämien isoliert (183), wobei vor allem hospitalisierte Säuglinge und Kleinkinder häufig betroffen sind. Von den drei Klebsiellen-Spezies wird K.pneumoniae weitaus am häufigsten isoliert.
Die Chemotherapie von Klebsielleninfektionen kann, vor allem bei hospitalisierten Patienten, erhebliche Schwierigkeiten bereiten. Neben der Primärresistenz gegenüber Ampicillin, die praktisch allen Klebsiellen-Stämmen eigen ist, treten bei Hospital-Stämmen die verschiedensten Resistenzdeterminanten auf, die das anwendbare Spektrum von Chemotherapeutika außerordentlich einschränken können (224).

Beim Darmgesunden sind die Keimzahlen mit 10^3 - 10^4 Keimen pro g Stuhl relativ niedrig. Verschiedene Antibiotika, z.B. Aminopenicilline konnen jedoch einen Selektionsdruck ausüben und zu einer signifikanten Erhöhung der Klebsiellen-Keimzahl führen.

4.3.3.4 Enterobacter sakazakii

Die Enterobacter sakazakii-Spezies sind mit den Klebsiellen eng verwandt. Die Stoffwechselindikatorreaktionen entsprechen weitgehend denen der Klebsiellen (151), Ausnahmen hiervon gibt es bei der Harnstoffspaltung und beim Abbau des Lysins, diese Reaktionen sind bei Enterobacter sakazakii negativ. Der Ornitinabbau ist gegenüber den Klebsiellen positiv. Die Enterobacter sakazakii sind beweglich. Infektionslokalisationen entsprechen mit Atemwegsinfektionen und Pneumonien sowie Harnwegsinfektionen weitgehend denen der Klebsiellen-Spezies.

4.3.3.5 Proteus mirabilis

Generelle Charakteristika der Proteus-Gruppe sind die fehlende Fähigkeit zum Laktose-Abbau und das Vorhandensein des Enzyms Phenylalanin-Desaminase. Eigentümlich insbesondere für Prot. mirabilis und Prot. vulgaris ist das "Schwärmphänomen". Proteus-Stämme sind peritrich begeißelt. Proteus-Bakterien sind in der Natur weit verbreitet. Wie die anderen Enterobacteriaceae findet man sie auch in der Intestinalflora des Menschen, allerdings quantitativ in kleinen Keimzahlen (151). Durch O- und H-Antigene lassen sich die meisten Stämme serologisch typisieren; doch hat diese Bestimmungsmethode keine große Verbreitung gefunden (223). In erster Linie lösen diese Stämme Harnwegsinfektionen aus. Andere Infektionslokalisationen sind selten (z.B. Septikämie, Cholecystitis, Pneumonien). Die Empfindlichkeit gegen Chemotherapeutika ist bei den einzelnen Spezies sehr unterschiedlich. In der Reihenfolge Prot. mirabilis, Prot. vulgaris, Prot. morganii und Prot. rettgeri nimmt der Grad der Sensibilität ab (183). Man findet sie vor allem bei Patienten urologischer Abteilungen als Hospitalkeime; auch bei Patienten mit neurogener Blasenlähmung (z.B. Querschnittsgelähmten (224)) treten sie mit schicksalshafter Regelmäßigkeit auf.

Ausgehend von Untersuchungen über Unterschiede im Enzymspektrum hat es sich eingebürgert, von Indol-positiven und Indol-negativen Proteus-Stämmen zu sprechen. Indol-positive Stämme besitzen das Enzym Tryptophan-Desaminase, das Tryptophan zu Indol desaminiert. Diese Indolbildung läßt sich mit einem geeigneten Indikator nachweisen (223). Der in unserer Versuchsanordnung verwendete Proteus mirabilis ist indol negativ.

4.3.3.6 Streptococcus faecalis

Die Einteilung der Gruppe der Streptokokken wird nach der Art ihrer hämolysierenden Wirkung auf den Blutagarnährboden sowie nach gruppentypischen Antigenen vorgenommen.
Die Hämolyse ist in 4 Stufen eingeteilt (151):

1. Die α-Hämolyse entspricht meist den vergrünenden Streptokokken. Unmittelbar um die Kolonie findet man regelmäßig grüne bis schwarze Höfe.
2. Die β-Hämolyse zeigt sich durch eine relativ große, scharf begrenzte Zone mit vollständiger Hämolyse.
3. Die γ-Hämolyse ruft im allgemeinen keine Veränderungen des Nährbodens hervor; jedoch können gelegentlich kleine, unscharf begrenzte Aufhellungen oder Vergrünungen auftreten.
4. Die α'-Hämolyse nimmt eine Mittelstellung zwischen α- und β-Hämolyse ein. Die Hämolyse ist stärker ausgeprägt als die der α-Hämolyse.

Man unterscheidet weiterhin nach Antigenfraktionen. Es existieren P-, C-, T- und M-Substanzen, die unterschiedliche Bestandteile der Bakterienzellwand repräsentieren (223).
Neben diesen biochemischen Charakteristika zeigen viele Stämme eine typische Zellmorphologie; sie haben eine Tendenz zur paarweisen Lagerung (Diplokokken). Dabei sind die Bakterienzellen meist ovalär ausgezogen. Die Diplokokkenstrukturen wiederum sind häufig zu Ketten zusammengefügt. Die meisten Enterokokkenstämme wachsen auf Blutagarnährböden ohne Hämolyse, doch lassen sich auch Stämme mit β-Hämolyse finden.

4.3.3.7 Pseudomonas aeruginosa

Der Keim wurde Ende des neunzehnten Jahrhunderts erstmals gezüchtet und einige Jahre später als Erreger des "blauen Eiters" angesehen.
Pseudomonas aeruginosa, früher auch als Bakterium pyocyaneum, Ps. pyocyanea u.a. bezeichnet, ist ein schlankes gramnegatives Stäbchen, welches in der Natur vor allem im Boden und im Abwasser weit verbreitet ist. Insbesondere bei hospitalisierten Patienten läßt sich der Keim gelegentlich in Abhängigkeit von der Krankenhaushygiene auf der Haut gesunder und kranker Menschen sowie auch aus dem Stuhl isolieren (151).
Ps. aeruginosa ist polar begeißelt und somit gut beweglich. Für epidemiologische Untersuchungen bietet sich die serologische Typisierung der somatischen Antigene in verschiedene Serotypen an; darüber hinaus spielt heute die Bestimmung des Lysotyps und des Pyocintyps eine Rolle (223). Ps. aeruginosa läßt sich auf den gebräuchlichen Nährböden leicht anzüchten und zwar in aller Regel unter aeroben, selten auch unter anaeroben Bedingungen.
Ein mitunter charakteristischer süßlicher Geruch erleichtert die kulturelle Diagnose.
Beim gesunden Menschen verläuft eine Besiedlung mit diesem Keim meist ohne Symptome. Bei Patienten mit herabgesetzter Widerstandskraft dagegen spielt Ps. aeruginosa heute eine wichtige Rolle als Erreger nosokomialer Infektionen und wird zu der Gruppe der "opportunistisch pathogenen" Bakterien gezählt (77, 151). Häufige Infektlokalisationen in septisch-chirurgischen Abteilungen sind Hautinfektionen nach Verbrennungen sowie der Befall von Wunden. Besondere Bedeutung haben heute Harnwegsinfektionen (vor allem bei Patienten mit Blasenkatheter sowie nach urologischen Eingriffen). Wichtig sind weiter Infektionen des Mittelohres und des äußeren Gehörganges. Bei Neugeborenen spielen Pseudomonas-Septikämien heute eine große Rolle.
Ebenso kann Ps. aeruginosa bei Erkrankungen der Atemwege nachgewiesen werden. Die in den letzten Jahrzehnten in fast allen Teilen der Welt aufgetretenen Zunahmen der Pseudomonasinfektionen steht einerseits in Zusammenhang mit der Chemotherapie, andererseits mit der Vernachlässigung der klassischen hygienischen Verfahren (77).

4.3.4 Kritik zur Methode der Serumbakterizidiebestimmung

SCHLICHTER und Mitarbeiter stellten 1949 eine Methode zur Überwachung der Effizienz einer laufenden Therapie der bakteriellen Endokarditis mit Penicillin "G" vor. Dabei wurden die vom Patienten vor Beginn der Therapie gewonnenen Isolate der Keimspezies in vitro im Titerverfahren auf ihre Empfindlichkeit gegen das antibiotikahaltige Patientenserum getestet (178, 179). JAWETZ kontrollierte 1956 bis 1957 die kombinierte Therapie mit Antibiotika über einen gleichartigen Versuchsansatz (90) und vervollkommnete 1963 das Verfahren (89). Seither ist die Methode mit geringen Modifikationen vielfach angewandt worden. Dabei liegen die Hauptanwendungen noch heute auf dem Gebiet der bakteriellen Endokarditis sowie vor allem bei Patienten mit schwerer Grunderkrankung, insbesondere Malignompatienten und ihren Infektionen mit gramnegativen Keimspezies, hier wiederum vorwiegend Septikämien (105).

Über die klinische Aussagekraft der von SCHLICHTER eingeführten kombinierten in vivo / in vitro Untersuchungen ist häufig und kontrovers diskutiert worden. Ein Diskussionspunkt war die Variationsmöglichkeit in der Ausführung bzw. im labortechnischen Ansatz der Untersuchungen. Desweiteren sollte unsere Aufmerksamkeit auf die Problematik der Interpretation der Ergebnisse gerichtet werden.

Zur näheren Aufschlüsselung dieser Problematik sollen im folgenden der SBA-Test (Serum Baktericidal Aktivity) in seiner Arbeitsweise und seinen biochemischen Hintergründen aufgezeigt werden.

Dabei sind zu besprechen:

1. Die Rolle des Serums als Verdünnungsmedium und damit speziell die Probleme der Complementinaktivierung sowie der Proteinbindung von Antibiotika.
2. Das Nährmedium der Keimsuspensionen und dessen spezielle Zusammensetzung
3. Standardisierung von experimentiellen Größen wie Keiminoculationsmenge und Bebrütungsdauer sowie Definition des Serum-Bakterizidie Endpunktes.

ad. 1.) Beim Versuchsansatz der Serum-Bakterizidie wirkt humanes Serum auf zweierlei verschiedene Systeme unserer Untersuchungen ein. Zum einen ist hier das Complementsystem des Serums zu nennen, zum anderen die Antibiotikabindung an das Humanalbumin. Die keimabtötende Wirkung des Serums wurde schon sehr früh von GSCHEIDLEIN (78) 1874

erkannt. BUCHNER (217) führte 1890 die Untersuchungen fort und nannte die verantwortliche Komponente des Serums Alexin. Dieser Ausdruck wurde später von der Bezeichnung Complement abgelöst. Diese unspezifischen Faktoren sind primär vor dem ersten Kontakt des Organismus mit pathogenen Mikroorganismen bereits vorhanden und für die Fähigkeit des frischen, aktiven Humanserums, pathogene Keime abzutöten mitverantwortlich. Für diesen Effekt, der sowohl in vivo als auch in vitro (71, 165, 189) nachgewiesen werden konnte, hat sich der eigentliche Begriff Serum-Bakterizidie allgemein eingebürgert.Wesentlichen Anteil an dieser unspezifischen "humoralen Abwehr" haben verschiedene Proteinbestandteile des menschlichen Serums. Hierzu zählen die Opsonine (191), das Complementsystem (71), das Properidin (77) und das Lysozym (70).

Aktives Complement des antibiotikahaltigen Serums des Probanden bzw. des Patienten, kann die Absterbekinetik der untersuchten Keimspezies im Sinne eines Synergismus zum applizierten Antibiotikum beeinflussen.

Gleichartig wirkt auch das Zumischen von 50% humanem Poolserum zur Keimsuspension um die Versuchsbedingungen weitgehend den Voraussetzungen in vivo anzupassen. STRATTON und RELLER (18, 198) propagierten 1977 in ihren Arbeiten den Zusatz von 50% humanem Poolserum, zu einer mit Kalzium und Magnesium angereicherten MUELLER-HINTON-BOUILLON als vergleichsweise günstigste Annäherung an die Verhältnisse der Körperflüssigkeiten. Die Wirkungsintensität des Complementsystems und anderer Faktoren der unspezifischen Abwehr des Serums, wie z.B. Transferrin und Properidin, galt deshalb besonderes Interesse zahlreicher Untersuchungen.

So stellten FÜRBETH und ADAM (60) 1976 fest, daß der Faktor C 9 des Complementsystems als gemeinsames, membranschädigendes Agens einer Wirkungskaskade des übrigen Systems an der äußeren Bakterienzellmembran wirkt. Auch dem Properidin wurde eine unspezifische complementgebundene Aktivität gegen die Keimmembran zuerkannt, deren Reaktionseinleitung unter Verbrauch von Mg^{++} Ionen stattfindet. Der Angriffspunkt an der äußeren Zytoplasmamembran der gramnegativen Bakterienzelle wurde 1976 von NIKAIDO und DECAD (149) als Herauslösung von Polysacchariden mit einem Molekulargewicht von größer als ca. 600 beschrieben.

FEINGOLD und WILSON (52, 206) beobachteten bereits 1968 Einbrüche der Diffusionsbarriere der äußeren Zytoplasmamembran nach Einwirkung von Complement. Eine erhöhte Empfindlichkeit von derartig inkubierten Bakterienstämmen gegen in das Zellinnere penetrierende Antibiotika wie Aminoglycoside und Tetracykline (120, 204), aber auch von Ampicillin (46) wurde beschrieben. Der genaueren Quantifizierung dieser Beobachtung galten die Experimente von CHARLES et al. 1975 (204). Hier wurden complementsensible Stämme E. coli im Checkerboard Ansatz im Titerverfahren auf ihre Empfindlichkeit auf unterschiedliche Kombinationsfraktionen von Serum und Antibiotika untersucht. Es ergab sich hierbei auch ein additiver - synergistischer Effekt für Penicillin G sowie für Ampicillin. DUTCHER zeigte 1978 (46) eine deutliche Wirkungsverstärkung bei Ampicillin unter Einfluß von humanem Serum bei E.-coli-Stämmen. Diese Ergebnisse legten den Schluß nahe, daß auch die Diffusionseigenschaften zumindest für Penicilline zu ihren Targetenzymen der Mureinsynthese durch Einwirkung von Complement verbessert werden. Genauer untersuchte DUTCHER (46) diese Zusammenhänge durch Vorinkubation der Keimsuspension mit humanem Serum und stellte im Gegensatz zum gleichzeitigen Angriff von Humanserum und Antibiotikum eine beschleunigte Absterbekinetik in den so vorgeschädigten Bakterienpopulationen fest. Nach Arbeiten von ROANTREE, FIERER und TRAUB et al. (53, 163, 202) waren 7,4 bis 61,5% aller gramnegativen Isolate von Blutkulturen gegenüber Complement empfindlich. Unter Berücksichtigung der teilweise durchaus konträren Versuchsergebnisse sowie der mangelnden Vergleichbarkeit derselben, auf Grund nur wenig standardisierter Versuchsbedingungen, inaktivierten viele Autoren von vornherein das humane (-Pool) Serum (12, 18, 155, 198). Für einige Substanzen, z.B. Penicilline und Cephalosporine, ist die Hitzeinaktivierung 30 Min., 56° C (6) wegen ihrer Temperaturlabilität nicht wünschenswert. Die Entfernung durch spezifische Immunpräzipitate bietet hier eine Möglichkeit. Andererseits schien es im Bemühen um weitgehend den in vivo Bedingungen angepaßte Versuchsbedingungen sinnvoll, die bakterizide Eigenaktivität des Serums als Einflußgröße in das Versuchsergebnis eingehen zu lassen und parallel einen Serumbakterizidieleerwert für die entsprechenden Keimspezies mitlaufen zu lassen (15).

Das Problem der Beeinflussung des SBA-Testes durch die Proteinbindung von antimikrobiell wirksamen Substanzen an Human-Albumin (117, 180), ist nicht streng gegenüber den Ausführungen bezüglich des Complementsystems abzugrenzen. Die Untersuchungen über den Wirkungsverlust von Antibiotika in Versuchsansätzen mit humanem Serum sind ebenfalls nicht einheitlich interpretierbar und sicher von Einwirkungen der bakteriziden Eigenaktivität, aber auch anderer Faktoren (18, 159, 198) überlagert.

KUNIN (117) stellte 1967 generell für an Serumprotein hochgebundene Antibiotika Beeinträchtigungen der MHK-Werte im Sinne einer Wirkungsabschwächung im Serum fest. Diese Formulierung bezog sich jedoch vornehmlich auf die Verhältnisse in vivo.

STRATTON und RELLER (18, 198) versuchten 1977 in Anlehnung an Versuche von PIEN und VOSTI (155) diese Überlegungen auf in vitro Versuchstechniken mit inaktiviertem Humanserum zu übertragen. Sie zeigten in vergleichenden Untersuchungen mit Nährmedien auf der Basis der MUELLER-HINTON-BOUILLON mit verschiedenen Humanserum- und Human-Albumin-Anteilen als Zusatz eine dem Nativserum ähnliche Eiweißbindung in MUELLER-HINTON-BOUILLON plus 50% Humanserum für Carbenicillin, Oxacillin, Cloxacillin und Dicloxacillin. Die bei diesen Penicillinen mit Eiweißbindung zwischen 60 und 90% durchgeführten MHK bzw. MBK-Bestimmungen erbrachten u.a. bei Anreicherung mit 50% Humanserum eine um drei Titerstufen herabgesetzte Empfindlichkeit von Staphylococcus aureus, gegenüber um ebenfalls drei Stufen erhöhter Empfindlichkeit von Pseudomonas aeruginosa sowie eine leichte Wirkungsverstärkung bei Escherichia coli auf Carbenicillin (198).

Nach ROLINSON und SUTHERLAND (164) sind diese Effekte für Einzelspenderseren sowie für POOL-Seren in gleicher Weise nachweisbar, Klinikpoolseren bedeuten jedoch eine weitgehende Sicherheit im Ausschluß individueller Normvarianten.

Die in unserem Versuchsansatz verwendeten Substanzen sind zu ca. 30% bei Azlocillin (181), bzw. 40% bei Moxalactam (9) an Serumeiweiß gebunden. Wirkungsabschwächung infolge Proteinbindung treten deshalb als Erklärungsansatz für die Ergebnisse der Serumbakterizidie-Methode in den Hintergrund.

ad. 2.) Ein Medium für das Serumbakterizdie-Verfahren sollte folgenden Anforderungen entsprechen (64, 69, 138):

1. Die zu untersuchenden Keimspezies sollten optimale Wachstumsbedingungen vorfinden, dabei gibt es keine universell verwendbaren Nährmedien.
   Wünschenswert wäre eine an jede zu untersuchende Keimspezies angepaßte Lösung. Da in einem solchen Versuchsansatz methodische Schwierigkeiten von Seiten der Vergleichbarkeit zu erwarten wären, war man versucht, eine bestmögliche allgemein und bis auf wenige Ausnahmen einsetzbare Nährlösung zu finden.
   Als Maßstab galten hier die Wachstumsanforderungen der problematischeren Keimspezies (17). Das Medium sollte anders als humanes Serum ph-stabil im physiologischen Bereich sein. Instabilität in dieser Eigenschaft bedeutet nicht nur mögliche Verschlechterung der Wachstumsbedingungen der Keime, sondern gegebenenfalls auch Wirkungsverlust durch ph-Labilität der antimikrobiell wirksamen Substanzen. Der ph-abhängige Proteinbindungsanteil vieler Antibiotika ist oft nur in physiologischen Grenzen untersucht (117) und bei hochgebundenen Substanzen mit Unwägbarkeiten behaftet.
   Die MUELLER-HINTON-BOUILLON wurde in den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen als Nähr- bzw. Verdünnungsmedium verwendet.
   Als festes Medium wurde sie ursprünglich für die Kultivierung von Gonokokken und Meningokokken entwickelt (143) und für den Transport und Isolierung von Meningokokken empfohlen (80).
   Heutzutage wird MHB-Agar hauptsächlich zur Empfindlichkeitsbestimmung von schnellwachsenden aeroben Mikroorganismen gegenüber Chemotherapeutika eingesetzt. Dieser Nährboden wird von der Food and Drug Administration, dem National Committee for clinical Laboratory standards (144), der International Collaborative Study (51), der WHO und dem DIN-Entwurf 58940 für die standardisierte Empfindlichkeitsmessung nach BAUER et al. (20) mit der Testblättchenmethode (167) empfohlen.
   Die hemmstofffreien MHB-Medien werden gegenwärtig als diejenigen Nährböden angesehen, mit denen die reproduzierbarsten Ergebnisse zu erzielen sind (139). Sie enthalten ein reiches Nährstoffangebot, das ein üppiges Wachstum auch von anspruchsvollen Mikroorganismen gewährleistet. Die zugesetzte Stärke kann toxische Stoff-

wechselprodukte der Mikroorganismen absorbieren und ist für das Wachstum mancher, sehr anspruchsvoller und in geringer Anzahl vorliegender Organismen notwendig.
Die Anreicherung der Nährmedien mit Ca^{++} und Mg^{++} sowie anderen zweiwertigen Ionen, ist von verschiedenen Autoren als günstige Ergänzung und Anpassung an Serumbedingungen durchgeführt worden (12, 18, 64, 69, 138, 198, 215). Dem lagen Untersuchungen zugrunde, die sich mit den Ergebnissen der Empfindlichkeitsbestimmungen von Pseudomonas aeruginosa Spezies auf verschiedene antimikrobielle Substanzen, vorwiegend jedoch Aminoglykoside beschäftigten (64, 69, 138, 215). Dabei stellte sich heraus, daß die Anwesenheit von Ca^{++} und Mg^{++} Ionen in physiologischen Konzentrationen die Ansprechbarkeit von zahlreichen Pseudomonas aeruginosa-Stämmen auf Gentamicin um das 4fache verringerte (198).
Ein derartiger Effekt konnte nach Untersuchungen von RELLER und SCHOENKNECHT (17) für Carbenicillin nicht nachgewiesen werden.
In unsere eigenen Versuche sollten die hier diskutierten Aspekte und Erfahrenswerte möglichst weitgehend einfließen. Das so gewählte Nähr- und Verdünnungsmedium - MHB supplimiert + 50% Human-Serum - entspricht den Vorstellungen zahlreicher Autoren (12, 17, 18, 20, 51, 64, 138, 198, 215) sowie den internationalen Vorschlägen der WHO und der FDO für ein standardisiertes Medium zur Empfindlichkeitstestung von Antibiotika.

ad. 3.) Die abschließend hier zu besprechenden Punkte der Keiminokulationsgröße, der Bebrütungsdauer der inoculierten Testblättchen bzw. Reihenverdünnungsplättchen und der Definition des Endpunktes einer bakteriziden Wachstumskontrolle, unterliegen in der weltweiten Ausführung beträchtlichen Modifikationen.
So fanden PIEN und VOSTI (154) in ihrer Studie über die Variationen in der Ausführung der Serumbakterizidie-Untersuchungen eine Variabilität der Keimeinsaatmengen um den Faktor 1000. Dabei reicht das Spektrum der Keimkonzentrationen in den Suspensionen von $1:10^2$ Keime bis $1:10^5$ Keime/ml und das Inokulationsvolumen von 0,01 ml bis 1,0 ml.
In nur 8 der 28 befragten Laboratorien wurde eine Standardisierung der Inokulationsgröße durchgeführt. JAWETZ (89) stellte 1962

das Problem der Abhängigkeit der bakteriziden Aktivität von Antibiotika von der Menge der verwendeten Keimeinsaat heraus. So führte eine übermäßig hohe Keimeinsaat zu irreführend niedrigen MBC-Werten bzw. umgekehrt der entsprechende Effekt zu hohen MBC-Werten (67). Die International Collaborative Study of Antibiotic Sensitivity Testing (51) empfahl 1971 zur weltweiten Angleichung der SBA-Ergebnisse eine Inokulationsgröße von 10^5 - 10^6 Keime/ml in einer 1:1 Vermischung mit Testserum auf ein Gesamtvolumen von maximal 2 ml/Verdünnungsstufe. Kleinere Inokulationsgrößen induzierten nach BERRY und LASNER (16) Fehler in der Bestimmung der SBA dadurch, daß zu große Subkultivierungsvolumina erforderlich werden, um noch ablesbare Keimkolonien nach der Titration im Ausstrich zu liefern, wobei es zu einem "drug carry over" auf die Ausstrichplatte kommen kann. Diese Antibiotikaübertragung sollte durch kleinere Subkultivierungsvolumina und große Ausstrichflächen verhindert werden (12).

Als Bebrütungsdauer der zubereiteten Verdünnungsstufen setzte sich allgemein ein Zeitraum von 18 - 24 h durch. Diese Bebrütungszeit war das Resultat pragmatischer Bemühungen um eine Standardisierung dieser Größe unter Einbeziehung der labortechnischen Erfordernisse, d.h. einer bestmöglichen Ablesbarkeit der Ergebnisse sowie den Wachstumsanforderungen der Keime.

EAGLE (47) beschrieb 1948 und 1950 die Verhältnisse am Wirkort in vivo als deutlich andere, als die in vitro in bezug auf die unvergleichbar hohe Einwirkdauer im Versuchsansatz, die schwer vorhersehbare Wachstumssituation der möglicherweise unterschiedlich empfindlichen Keimpopulationen sowie das Wachstumsmilieu (89).

Die minimale Letalitätsdosis eines Chemotherapeutikums ist nicht einheitlich definiert. Das hat zum einen biologische, zum anderen methodische Gründe:

Es werden in einer Keimpopulation die größer als 1 Million Keime ist, mit großer Wahrscheinlichkeit Spontanmutationen auftreten, die keine oder eine herabgesetzte Empfindlichkeit für die verwendete Substanz aufweisen. Außerdem ist hier auf das Problem der sogenannten Persisters, d.h. metabolisch inaktiver und damit auf z.B. ß-Lactam- Antibiotika unempfindliche Keime hinzuweisen, ihr Auftreten liegt bei ca. 0,1% (59, 168). Methodische Gründe für die

Schwierigkeit einer einheitlichen Festlegung des Serumbakterizidie-Endpunktes liegen in der rechnerischen Ermittlung der Abtötungs- bzw. Überlebensrate. Deshalb sind diese Versuche vom Ansatz, d.h. von der Inokulationsgröße, den Serumvolumina und der Ausstrichfläche so anzulegen, daß eine auszählbare, überschaubare Koloniezahl für die Bestimmung der MBK-Werte übrig bleibt. In unseren Versuchen hat sich dabei eine Abtötungsrate von 99,9% resp. einer Überlebensrate von 5 - 10 CFU (colonie forming units) auf der Ausstrichplatte als praktikable Lösung herausgestellt (12). PIEN und VOSTI (154) veröffentlichten 1974 in ihren Untersuchungen über die Ausführungsmodalitäten der SBA-Bestimmungen Bakterizidie-Endpunkte von 0 - 50 CFU bzw. Inoculationsgrößen zwischen 10^2 und 10^3 Keime/ml. Eine Alternative zu dieser Messung ist die Bestimmung der Überlebensrate einer Keimpopulation unter standardisierter Antibiotika-Konzentration sowie die Festlegung einer 50%igen Letalitätsdosis.

Einige Autoren bevorzugten diese Methode im Hinblick auf die unphysiologisch langen Einwirkzeiten bei der Bestimmung der minimalen bakteriziden Konzentration (MBK). Die Interpretation der SBA-Ergebnisse wird unabhängig von Versuchsmethodik und Definition der vollständigen Bakterizidie von zwei weiteren Eigenarten der Bakterienkinetik erschwert:

EAGLE und Mitarbeiter (47) beobachteten 1948 bei in vitro Untersuchungen von grampositiven Erregern eine Abschwächung der bakteriziden Wirkung von Penicillin G bei Konzentrationen die weit über der MHK lagen. Andere Arbeitsgruppen (197) konnten diese Erscheinungen experimentell nachvollziehen. Dieser paradoxe Effekt kommt wahrscheinlich durch Interferenz der hochdosierten Antibiotika mit dem Bakterienzellwandstoffwechsel zustande (12). Er ist bisher nur bei Enterokokkenstämmen beobachtet worden (184). Durch diesen Umstand kann es bei Enterokokken im SBA-Test mit Penicillin G zum Wiederauftreten von Keimwachstum in Titerstufen weit über der MBC kommen. Antibiotikatoleranz einer Bakterienspezies ist definiert als MBC/MIC von größer als 32 nach 24 h Bebrütung (168,171). Dabei bedarf es einer gegenüber der MIC vielfach höheren Konzentration einer antimikrobiellen Substanz um die Keime zur Abtötung zu bringen. Diese Eigenschaft der Keime kommt nach längeren Ein-

wirk- bzw. Bebrütungszeiten nicht mehr zum Tragen, für den klinisch therapeutischen Aspekt muß sie auf jeden Fall berücksichtigt werden. Insbesondere sind hier Infektionen mit toleranten Staphylokokken hervorzuheben (73, 168). Alle hier näher aufgeführten Probleme der SBA-Bestimmung treten für den Versuchsansatz im Micro- wie im Macro-Verfahren auf. Durch Rationalität und Verwendung geringer Serummengen im Micro-Verfahren erlebte diese Art des Versuchsaufbaues einen deutlichen Aufschwung in den letzten 10 Jahren. Die Übereinstimmung der Versuchsergebnisse beider Verfahrensweisen waren deshalb Gegenstand einiger Untersuchungen (157, 201). Dabei zeigte sich eine Korrelation der Ergebnisse von 92 - 99% für $\pm$ 1 Verdünnungsstufe, bzw. 76 - 88% für exakte Übereinstimmung. Die Reproduzierbarkeit lag nach THOMAS et al. (201) bei der Macro-Technik mit 99,1% etwas besser als bei der Micromethode mit 94,8%.

4.3.5 Kombination von β-Lactam-Antibiotika

Für die Kombination von Antibiotika gibt es heute relativ klar umrissene Indikationen. Sie ergeben sich aus Erfahrungswerten von ca. 4 Jahrzehnten Antibiotika-Forschung und gehen auf Untersuchungen von HUNTER (86) 1946 zurück, in denen von synergistischen Kombinationen von Penicillin und Streptomicin gegen Enterokokkenisolate bei Endocarditis berichtet wurde. KLEIN und KIMMELMANN untersuchten 1947 (108) Staphylococcus aureus Stämme unter derselben Kombination und fanden ebenfalls Synergismus. JAWETZ und GUNNISON (91) formulierten 1952 erstmals grundsätzliche Richtlinien zur Kombination von Antibiotika und deren therapeutischen Anwendungsgebieten. Die heute übliche Differenzierung der Wirksamkeit von Antibiotika-Kombinationen in Synergismus gegenüber additiver Wirkung und Indifferenz bis zum Antagonismus, wurde von LOEWE 1953 (129) und von JAWETZ 1954 (88) definiert.

Aus diesen und vielen anderen Untersuchungen zu diesem Thema, gingen die Voraussetzung für die kombinierte Chemotherapie von bakteriellen Infektionen wie folgt hervor (31, 218):

Die Kombination soll

1. bei schwerkranken Patienten mit bisher nicht isoliertem Erreger ein möglichst breites Wirkungsspektrum effektiv erfassen,

2. ein ausreichendes Spektrum bei Mischinfektionen erbringen,

3. die Entwicklung von Resistenzen während der Therapie verhindern,

4. möglichst bakterizid bei Patienten mit gestörter Immunabwehr wirken,

5. in ihrem Zusammenwirken möglichst additive bis synergistische Effekte auf die Keimabtötung zeigen.

Der Mehrzahl dieser Forderungen entsprachen bis vor wenigen Jahren nur Kombinationen von Aminoglycosiden mit β-Lactamantibiotika. Speziell für Infektionen von schwer immungeschwächten Patienten mit Pseudomonas Spezies und anderen Problemkeimen, zeigten solche Kombinationen synergistische Effekte und entsprechende klinische Erfolge (50, 190, 192). Seither wurden Aminoglycosid/Penicillin bzw. Cephalosporin-Kombinationen vielfach in vitro und in vivo studiert und ihre klinische Wirksamkeit sowie ihre nephrotoxischen und ototoxischen Nebenwirkungen hervorgehoben (96, 102). Das Bemühen um weniger toxische Verbindungen und die Entwicklung neuer semisynthetischer Penicilline bzw. Cephalosporine führten zur Erprobung hochwirksamer β-Lactam-Antibiotika in kombiniertem Einsatz. Penicilline und Cephalosporine haben dabei ein breites Wirkungsspektrum, gemeinsam wirken sie gegenseitig ergänzend. Ureidopenicilline decken dabei in ihrer Wirkung die Pseudomonas species und Enterokokkenlücke der Cephalosporine ab, wogegen die modernen Cephalosporine eine gute Aktivität gegen β-Lactamase produzierende Enterobacteriaceae aufweisen (196).
Jede in vitro Untersuchung von Kombinationen antimikrobiell wirksamer Substanzen sollte grundsätzlich unter standardisierten Bedingungen und die Festlegung der Wirkungsqualitäten nach vordefinierten Maßstäben vorgenommen werden (20, 30, 154). Heute werden dafür hauptsächlich zwei Methoden angewandt:

1. Der als "Screening Untersuchung" geeignete Agar Diffusionstest, bei dem Erweiterungen oder Abflachungen der Hemmhöfe im Diffusionsbereich der Substanzen zu beobachten sind. Hier läßt sich kein Rückschluß auf die Konzentrationsbereiche dieser Interaktionen ziehen.

2. Die sogenannte Checkerboard Titration. Sie ist die Methode zur quantitativen Bestimmung der Beziehungen zwischen Antibiotika und stellt dieses Zusammenwirken durch FIC Indices dar. Der FIC-Wert (Fraktionierte Inhibitorische Konzentration) errechnet sich aus dem Quotienten von z. B. der niedrigsten Konzentration der Substanz "A", die zusammen mit einer bestimmten Konzentration der Substanz "B" eine Hemmwirkung zeigt, und der MHK von "A".

Formel: $\frac{(A)}{MHK\ A}$ = FIC A FIC A + FIC B = FIC Index

Wird z.B. von jeder Substanz A / B nur die Hälfte der MHK zur Hemmung in der Kombination nötig sein, so ergibt sich der FIC Index 1. Ist die volle MHK von beiden erforderlich, errechnet sich der FIC Index 2. Die Interpretation dieser Titrationsversuche ist nicht einheitlich.
KUCK und KLASTERSKI (100, 115) u.a. verstanden unter Synergismus eine vielfache Reduktion der MHK in der Kombination, entsprechend FIC Index 0,5 , andere Autoren wie WISE (212) und BERENBAUM (22) lagen mit FIC Indices 0,6 - 1 darüber.
Antagonismus wurde nach DREWS (44) bei FIC größer als 1, hingegen bis FIC größer als 4 bei DASCHNER (39) definiert.
Unter Berücksichtigung der beträchtlichen Fehlerbreite einer Titrationsanordnung gilt im allgemeinen der Bereich von 0,5 - 4,0 FIC Index als indifferent. Die graphische Darstellung erfolgt üblicherweise mit sogenannten Isobologrammen (129, Abb. 37). Dabei werden auf Abszisse und Ordinate die Konzentrationen von Substanz "A" und Substanz "B" allein und in Variationen derselben dargestellt, die den identischen, biologischen Effekt (MIC) oder (MBC) bewirken. Die Linie, die die Punkte gleicher Wirksamkeit von verschiedenen Fraktionen "A" bzw. "B" verbindet, wird Isobol genannt.
Der Kurvenverlauf zeigt damit Antagonismus (für den konvex gewölbten Bogen über der geraden Indifferenzlinie) und additive Wirkung bzw. Synergismus (für den konkaven Verlauf darunter) an (Abb. 37).
LODE et al. (126) entwarfen eine der CHECKERBOARD-Methode angelehnte Vari-

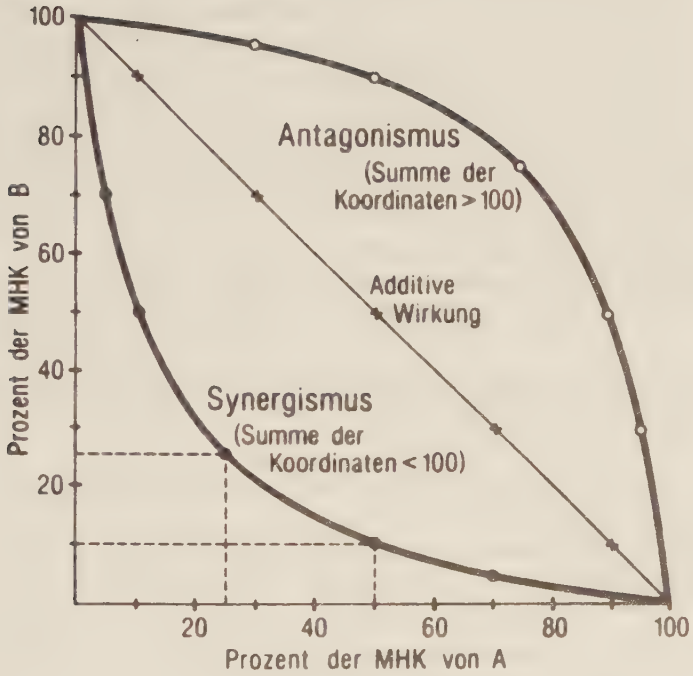


Abb. 37 Isobolendiagramm: die drei Isobolen stellen die prinzipiell möglichen Ergebnisse einer Kombination der Wirkstoffe A und B dar. (aus: Drews, J., Grundlagen der Chemotherapie, Springer Verlag, Wien '73)

ante mit fixen Einzelkomponenten und variablen Konzentrationen der zweiten Antibiotika-Komponente. Die Interpretationsbreite der hier beschriebenen Wirkungsqualitäten, hängt von der Definition der Begriffe ab.
Die CHECKERBOARD-Titration ist ein technisch aufwendiges Verfahren, das mit präparierten Verdünnungsstufen verschiedener Antibiotika arbeitet. Es setzt exakt bekannte Konzentrationen der zu untersuchenden Substanzen voraus. Methodische Präzision und theoretische Aussagekraft zeichnen diese Untersuchungsanordnung aus, die zum Teil stark wechselnden Bedingungen im Organismus bleiben dabei weitgehend unberücksichtigt (82).
KLASTERSKI hob die Bedeutung der SBA-Bestimmung aus Patientenserum als resultierender, übergeordneter Faktor der Antibiotika-Therapie hervor (82).

Wirkungsmechanismen der kombinierten β-Lactam-Antibiotika-Therapie

Der gemeinsame Wirkungsmechanismus der β-Lactam-Antibiotika ist die Hemmung der Zellwandsynthese (199, 200). Sind in einem Medium mehr als ein Penicillin bzw. Cephalosporin, so konkurrieren sie beide um den gemeinsamen Bindungsort in der Zytoplasmamembran des Bakteriums (48). Der durch die Rezeptorbindung am Penicillinbindungsprotein (PBP) erzielte Effekt, ist nicht von der gebundenen Substanz, sondern von der Art des bindenden Rezeptors abhängig. Dies wird deutlich aus Untersuchungen die zeigen, daß Unterschiede in der Wirkung von β-Lactam-Antibiotika mit unterschiedlichen Affinitäten zu Bindungsproteinen korrelieren (48). Die PBP's sind bisher bei der Mehrzahl der Enterobakterien nachgewiesen worden. Es existieren bei diesen Stämmen vergleichbare Muster von mindestens 7 Penicillin-Bindungsproteinen. SPRATT (193) trennte die radioaktiv markierten PBP's von Proteus mirabilis in der Gelelektrophorese auf und untersuchte die Affinität verschiedener β-Lactam-Antibiotika für die Einzelkomponenten. Für die Mehrzahl der PBP's ist eine enzymatische Aktivität nicht bekannt, für Proteus mirabilis wurde jedoch eine wachstumshemmende Wirkung bei Bindung an PBP 4 und 5 selektiv nachgewiesen (166). Bindungen von β-Lactamen an spezifische Rezeptoren bedingten so auch typische Wachstumsformen der unterschiedlichen Bakterien Species, je nach Funktionsausfall bzw. Hemmung. Eine deutlich bessere Wachstumshemmung konnte in jedem Fall beobachtet werden, wenn mehrere PBP's inaktiviert wurden. β-Lactame, die gemeinsam an einem einzigen PBP angreifen, lassen deshalb in der Kom-

bination keine Wirkungsverstärkung erwarten (166). Kombinationen mit Angriffen an PBP 4 und PBP 5 bei Proteusmirabilis z.B. zeigten sich in ihrer Wirkung synergistisch. Bei E. coli dagegen sind für PBP 4 - 5 und 6 keine Hemmungseffekte beschrieben, hier scheint PBP 1 der für β-Lactam-Antibiotika empfindlichste Rezeptor zu sein (193). Für die Chemotherapie mit β-Lactam-Antibiotika ist es also von Bedeutung, ein möglichst breites Spektrum von empfindlichen PBP's innerhalb einer bekannten Bakterien-Population abzudecken. Für einige Kombinationen, wie z.B. Mecillinam und ein anderes β-Lactam, sind überwiegend günstige Ergebnisse bekannt, da Mecillinam an PBP 2, die meisten anderen β-Lactame an PBP 1 oder 3 binden (174). Ein anderer Mechanismus synergistischer Wirkung von β-Lactamen ist die gegen- oder einseitige Hemmung der β-Lactamase gramnegativer Bakterienzellen (4). Dabei fungiert die Substanz mit der geringeren intrinsischen Aktivität für PBP durch Komplexbildung mit der β-Lactamase als Hydrolyseinhibitor, der zweiten Substanz wird so die Bindung an ihr PBP ermöglicht. Voraussetzung für diese Funktionsteilung sind also

für den Inhibitor der β-Lactamase : Hohe Affinität für das aktive Zentrum der β-Lactamase; hohe β-Lactamase-Stabilität.

Für die antibiotisch aktive Substanz: Große intrinsische Aktivität an PBP. Geringe Affinität zur β-Lactamase.

Dieser Effekt, der z.B. für Kombinationen von β-lactamasestabilen Penicillinen mit Cephalosporinen zum Tragen kommt, kann sich jedoch nachteilig auswirken: So induzieren gerade β-lactamasestabile Cephalosporine die Produktion von β-Lactamasen bzw. Cephalosporinasen (174).
Der günstige Effekt des Wegfangens von β-Lactamase geht so im Überangebot von induzierten Enzymen verloren, die Menge an verfügbarem Antibiotikum fällt in der Bilanz ab. Dieser Mechanismus wurde für starke β-Lactamase-Induktoren wie Cefoxitin in Kombination mit Moxalactam, Cefotaxim und Ceftazidim beschrieben (174).
Induktoren mit ähnlich hoher intrinsischer Aktivität am PBP wie die β-lactamasestabilen β-Lactame, lösten den antagonistischen Effekt deutlicher bei subinhibitorischen Konzentrationen (1/4 MIC) aus (4). Dabei tritt die induzierende, gegenüber der eigenen antibiotischen Wirkung in den Vordergrund. Höhere Konzentrationen heben die antagonistische Wirkung

durch Überwiegen des Substanzangebotes am Rezeptor wieder auf.
ACAR et al. (4) stellten 1975 diesen Umstand an Hand eines biphasischen Isobolograms für die Kombination von Carbenicillin und 6-Aminopenicillansäure dar. Die Interaktionen zwischen /3-Lactam-Antibiotika beschreiben abhängig von untersuchter Arzneimittelspezialität und Keimspezies ein dynamisches Wirkungsgefüge. Wirkungsmechanismen können sich in Einzelapplikationen und Kombinationen von antimikrobiellen Substanzen durch Induktionen von inaktivierenden Enzymen und durch Mutation von Bindungsproteinen ändern.
Die folgende Gegenüberstellung soll die Zusammenhänge verdeutlichen (174):

Synergismus		Antagonismus	
S 1	Inaktivierung von /3-Lactamase durch Inhibitor, enzymlabile /3-Lactame erreichen den Rezeptor (PBP)	A 1	Induktion von /3-Lactamase
S 2	Angriff an verschiedenen PBP der Zytoplasmamembran	A 2	Induktion einer /3-Lactamase/ /3-Lactam-Komplex Barriere, aktive antimikrobielle Substanz wird weggefangen

Beispiel f. beteiligte Keim-Spezies

S 1	Staph. aureus, gramneg. /3-Lactamase Produzenten (/3-Lactamase Typ II, III, IV, V)	A 1	Enterobacteriaceae mit induzierbarer Typ I /3-Lactamase (Enterobacter, Serratia, Citrobacter)
S 2	Enterobacteriaceae	A 2	Enterobacter, Pseudomonas Sp. mit induzierbarer Typ I /3-Lactamase

Daraus wird erkennbar, daß eine Wirkungsvoraussage im Hinblick auf ein einziges Charakteristikum einer antimikrobiellen Substanz wie z.B. Enzymstabilität nicht gegeben werden kann. Vielmehr kann dieselbe Eigenschaft je nach Keimspezies und genetischem Muster einmal zum Synergismus, ein an-

deres Mal zum Antagonismus in einer Kombination mit anderen β-Lactam-Antibiotika führen. Die Prognose eines möglichen Therapieerfolges mit Kombinationen von β-Lactamen kann sich daher nur auf Empirie stützen. In zahlreichen Untersuchungen wurde von überwiegend indifferenten bis additiven, selten synergistischen (54, 84, 169, 170, 200) Kombinationen berichtet. Antagonistische Effekte wurden fast ebenso häufig beobachtet. Diese Ergebnisse sind je nach Versuchsmethode und untersuchter Keimspezies zu bewerten. NEUHAUS (148) erforschte 1978 die Empfindlichkeit von 558 Enterobacteriaceae und Pseudomonaceae auf Kombinationen von Azlocillin, Cefalotin, Cefamandol, Cefoxitin und Cefuroxim im Agardiffusionstest mit Testblättchen. Dabei stellte sie zusammenfassend fest, daß bei der überwiegenden Mehrheit der Kombinationsanordnungen, ein Antagonismus von Cefoxitin (88%) ausging. Diese Beobachtungen fanden sich überdurchschnittlich oft bei Enterobacter cloacae (Enterobacter sakazakii) und Proteus morganii. Antagonistische Effekte zeigten sich insgesamt bei Enterobacteriaceae in 7,6%, bei Pseudomonaceae in 21%. Substanzpaare für synergistische Wirkung kristallisierten sich nur undeutlich heraus. Für die in unserem Versuchsansatz beobachtete Gruppe der Enterobacteriaceae und Pseudomonas Species, sind keine generell potenten Kombinationspartner bekannt geworden. Die klinische Relevanz derartiger Untersuchungen ist grundsätzlich nur durch Vergleiche von in vitro/in vivo-Studien festzustellen. Ideal wäre dabei die Erregerisolierung und in vitro-Testung auf das Ansprechen verschiedener Wirkstoff-Kombinationen, wenn ausschließlich die klinische Wirksamkeit synergistischer Kombinationen mit der Wirkung nicht synergistischer Wirkstoffkombinationen verglichen wird. KLASERSKY zeigte 1972 in klinisch bakteriologischen Studien, die nach diesen Gesichtspunkten durchgeführt wurden, daß nach Gabe von Wirkstoffkombinationen die in vitro als synergistisch erkannt wurden, eine signifikant bessere klinische Heilwirkung erzielt wurde, gegenüber denen, die sich in vitro nicht synergistisch verhielten (103). Dabei lagen die Serumbakterizidie-Titer von Patienten, die synergistisch behandelt wurden, deutlich höher, als bei denen, die keine synergistische Kombination erhielten. Im ersten Fall lag die Serum Bakterizidie bei Titerstufe 1:16, im zweiten Fall bei 1:4. Synergistische Kombinationen bewirkten also noch in geringeren Serumkonzentrationen ausreichende, bakterizide Wirksamkeit.
KLASTERSKY postulierte in seinen Arbeiten einen Serumtiter von 1:8 für derartig ausreichende Serum- und Gewebespiegel (99, 105) zur Bekämpfung gram-

negativer Bakteriämien. ANDERSON et al. (8) hatten Untersuchungen mit synergistischen Kombinationen 1974 für Patientenkollektive mit Granulozytopenien bei gramnegativer Sepsis durchgeführt und kamen zu übereinstimmenden Ergebnissen. Zusammenfassend bleibt zu bemerken, daß zur Vorhersage eines Therapieerfolges in der Kombinationstherapie mit /3-Lactamantibiotika eine Serumbakterizidie-Titerstufe größer als 1:8 in der in vitro-Kontrolle als Maßstab für klinische Effektivität angesehen werden sollte. Neben der (nicht immer möglichen) Dosissteigerung kommt dabei der Therapie mit synergistischen Wirkstoffkombinationen zum Erreichen bzw. Erhalten derartiger Serumspiegel besondere Bedeutung zu.

4.3.6 Interpretation der Serumbakterizidie

Bei der Bestimmung der Serumbakterizidie treten neben Problemen der technischen Standardisierung Schwierigkeiten bei der Interpretation der Ergebnisse auf. Sie sind in erster Linie auf mangelnde methodische Richtlinien zur Definition von signifikanten Unterschieden in den hier verwendeten Reihenverdünnungstests zurückzuführen.
Unter Berücksichtigung der Fehlerbreite mikrobiologischer Untersuchungen, insbesondere bei Serumverdünnungsmethoden (interindividuelle Schwankungen der Plasmaspiegel der 10 Probanden, manuelles Ablesen der CFU), sollte bei kleineren Stichprobenverhältnissen ein deutlicher Unterschied in der MBC größer als $\pm$ eine Serumverdünnungsstufe definiert werden (130).
KLASTERSKY (101) forderte 1976 zur Feststellung eines signifikanten Unterschiedes bei Vergleichen zwischen Einzel- und kombinierter Antibiotikawirkung eine vierfache Wirkungsverstärkung bzw. Abschwächung, entsprechend eines zweifachen Titeranstieges bzw. Abfalls im Reihenverdünnungstest. Diese Grundsätze entstammen hohen Stichprobenumfängen von Keimspezies (102, 104); für den in unseren Versuchsreihen praktizierten Mehrfachansatz von Probandenseren auf einen Bakterienstamm wurden die entsprechenden Richtlinien übernommen.
Synergismus wurde danach beschrieben, wenn in der Kombination gegenüber beiden Einzelapplikationen 4fache Wirkungsverstärkung eintrat. Additive Wirkung wurde festgestellt, wenn 4fache Wirkungsanstiege gegenüber einer Substanz und nur 2fache Steigerung (1 Titerstufe) gegenüber der anderen Substanz abzulesen war. Entsprechend wurde jeder geringeren Wirkung in der Kombination Indifferenz, ab 4facher Wirkungsabschwächung gegenüber beiden

Einzelsubstanzen Antagonismus zugeordnet (30, 101). Für die statistische Auswertung wurde der Vorzeichentest nach DIXON und MOOD (172) angewandt. Dieser Test dient in erster Linie zur Prüfung des Unterschiedes der zentralen Tendenz zweier verbundener Stichproben. Dabei sind mindestens 6 Paardifferenzen zur statistischen Ermittlung erforderlich. Da sich der Stichprobenumfang um die Nulldifferenzen reduziert, sind also in unseren Versuchen von 10 Serumansätzen mindestens 6 vorab als signifikant definierte Wirkungsverstärkung bzw. Abfälle nötig, um zu einer gesicherten Aussage zu gelangen.
Die Abb. 21 und 22 zeigen in graphischer Darstellung die reziproken Titerstufen nach logarithmischer Mittelwertbildung für die Einzel- und Kombinationsapplikationen von Azlocillin und Moxalactam.
Die Tabellen 23 bis 28 verzeichnen die Einzelergebnisse für die 10 Probandenseren im Ansatz gegen die verwendeten Keimspezies.

4.3.6.1 Synoptische Betrachtungen von Bioassay und Serum-Bakterizidie - 1 h Werte

Enterobacter sakazakii

Die Titerstufen für Azlocillin allein lagen einheitlich bei 1:4, für Azlocillin kombiniert mit Moxalactam nach logarithmierter Mittelwertbildung bei 1:14,9.
Im Vergleich zur Einzelapplikation von 5 g Azlocillin lagen die MBK-Werte für die Azlocillin-Kombination in 9 von 10 Fällen signifikant (größer als $\pm$ 1 Titerstufe) höher ($p=0,001$).
Moxalactam erwirkte in der Einzelapplikation durchschnittlich eine MBK von 1:7,3, gegenüber der Kombination mit Azlocillin von 1:14,9. Eine signifikante Wirkungssteigerung konnte dabei statistisch nicht festgestellt werden. Insgesamt ergab sich damit eine additive Wirkung. Damit entsprachen unsere Versuchsergebnisse nicht den Untersuchungen von LUBOSCHITZKY et al. (131), die bei Kombinationen von verschiedenen β-Lactam-Antibiotika für Enterobacter Species überwiegend einen indifferenten Wirkungstyp fanden. NEUHAUS (148) beschrieb 1981 für Enterobacter Species sogar eine erhöhte Häufigkeit für das Auftreten antagonistischer Effekte gegenüber anderen Enterobacteriaceae.
Nach KLASTERSKY (99) ist eine ausreichende Serumkonzentration ab einer Ver-

dünnungsstufe von 1:8 als MBK erreicht. Diese Bedingung erfüllt bei Enterobacter sakazakii 2 g Moxalactam allein. Die Kombination mit Azlocillin bringt demgegenüber noch zusätzliche therapeutische Sicherheit.

Klebsiella oxytoca

Die MBK-Titerstufen für die Azlocillin 5 g Einzeldosierung lagen gleichmäßig bei 1:4, in der Kombination mit Moxalactam nach Mittelwertbildung bei 1:14,9. Die MBK-Werte lagen in der Kombination in 9 von 10 Fällen signifikant höher ($< \pm$ 1 Titerstufe). Damit ist eine Tendenz zur Wirkungsverstärkung erkennbar (P = 0,001). Bei bekannten mittleren Serumspiegeln von Azlocillin (150,7 mg/l bei t = 1 h) ergab sich eine absolute MBK von 37,5 mg/l gegenüber 32 mg/l in den Vorversuchen und damit eine gute Übereinstimmung.

Die MBK von Moxalactam lag konstant bei 1:8 gegenüber 1:14,9 als Mittelwert in der Kombination. Für die Wirkungsverstärkung konnte trotz positiver signifikanter Unterschiede keine statistische Aussage gemacht werden, klinisch kann der Titeranstieg jedoch als relevant gewertet werden (99). Für die Kombination von Azlocillin mit Moxalactam liegt demnach ein additiver Wirkungstyp vor. 1983 berichtete ZINNER (225) über in vitro Versuchsansätze mit verschiedenen β-Lactam-Antibiotika gegen Klebsiella Species, in denen Synergismus nachgewiesen werden konnte. Auch in anderen Studien wurde speziell für Kombinationen von Thienamycin mit Moxalactam bzw. Azlocillin derselbe Effekt erkennbar (225). In vivo Experimente mit Klebsiella-Bakteriämien in Tierversuchen zeigten eine deutliche Überlegenheit der Kombination von β-Lactam-Antibiotika mit Aninoglykosieden gegenüber Kombinationen von β-Lactamen oder Einzelgaben (226).

E. coli

Azlocillin hatte gegenüber E. coli eine mittlere MBK von 1:6,9 gegenüber 1:8,9 in der Kombination mit Moxalactam. Für die Kombination zeigten sich gegenüber der Einzelgabe signifikante, positive Differenzen ($> \pm$ 1 Titerstufe), außerdem fielen 3 Proben in der Kombination um 1 Titerstufe ab. Eine statistische Aussage ist unter diesen Umständen nicht möglich.
Die mittlere MBK von Moxalactam war 1:5,4, gegenüber 1: 8,9 in der kombi-

nierten Applikation mit Azlocillin. Da nur in einem Fall ein signifikanter Titeranstieg zu verzeichnen war, ergeben sich auch hier keine Möglichkeiten einer statistischen Interpretation. Der Wirkungsmechanismus in dieser Kombination ist damit als indifferent zu bezeichnen. Literaturvergleiche für diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß für E. coli eine Aussage über die Wirksamkeit von Antibiotikakombinationen generell nicht gemacht werden kann.
So berichtete 1982 SANDERS (227) über antagonistische Kombinationen von Cefoxitin mit u.a. Azlocillin bei E. coli-Stämmen. ZINNER (226) wies für einige Stämme einen Synergismus bei der Kombination von Azlocillin mit Cefotaxim nach; andererseits wurde auch von Wirkungssteigerung bei gleichzeitigem Ansatz von Ampicillin oder Penicillin mit verschiedenen anderen β-Lactam-Antibiotika gesprochen (225).
In unseren Versuchen wurden klinisch relevante MBK-Titer für E. coli erst in der Kombination(1:8,9)beobachtet.

Proteus mirabilis

Die MBK-Mittelwerte für Azlocillin lagen bei 1:4,9 gegenüber 1:7,5 in der Kombination. Dabei traten keine signifikanten, positiven Differenzen zwischen beiden Gruppen auf. Für Moxalactam ergibt sich ein MBK-Mittelwert von 1:4 gegenüber 1:7,5 kombiniert. Hier sind ebenfalls keine positiven, signifikanten Differenzen festzustellen. Vergleichbare Daten für diese Ergebnisse lassen sich nur schwer heranziehen, da die Diskussion um die spezifischen Bindungsverhältnisse von β-Lactam-Antibiotika an der Bakterienzellmembran (PBP's) zeigte, daß chemisch ähnliche Antibiotika z.T. erhebliche Unterschiede in ihrer Affinität gegenüber diesen Rezeptoren aufweisen (193). Für Proteus mirabilis sind diese Verhältnisse relativ ausführlich untersucht. Danach ist zu beachten, daß die PBP's 4 und 5 den Hauptanteil am Wachstum der Zellwand haben (166). Penicilline, die nur einen Anteil, wie z.B. PBP 4 bei Ampicillin oder Amoxycillin, binden, hemmen das Wachstum nur unzureichend. RUTTKOWSKI et al. (166) stellten weiterhin fest, daß durch Penicillin G noch das PBP 1 A, 1 B und 3 besetzt werden, was zur Ausprägung von Rundformen führt, das Wachstum jedoch nicht beeinträchtigt. Es bleibt also auch in der Kombination der oben genannten Antibiotika eine vollständige Hemmung des Wachstums aus. Erst durch zusätzlichen Angriff am PBP 5, wie z.B. durch Moxalactam (166) konnte diese

Wirkung erreicht werden. Da in unseren Versuchen eine derartige Wirkungsverstärkung nicht zu beobachten war, müssen wir davon ausgehen, daß Azlocillin kein geeignetes Affinitätsmuster aufweist um die Moxalactamwirkung ausreichend zu ergänzen. Für Kombinationen von Thienamycin bzw. Cefotaxim mit Azlocillin wurde in vitro ein synergistischer Effekt beschrieben (225). SANDERS (227) berichtete dagegen von Antagonismus bei gleichzeitiger Gabe von Ampicillin bzw. Carbenicillin und Cephaloridin bzw. Cloxacillin bei Proteus mirabilis.
In unseren Versuchen ergab sich für die Kombination von Azlocillin und Moxalactam ein indifferenter Wirkungsmechanismus; die Wirksamkeit der Aktivitätstiter, sowohl in der Einzelapplikation von Azlocillin, wie in Kombination mit Moxalactam, erscheint aus klinischer Sicht als nicht hinreichend sicher.

Streptococcus faecalis

Die MBK-Werte lagen für Azlocillin gleichmäßig bei 1:8 gegenüber einem MBK-Mittelwert 1:8,6 in der Kombination. Bei dieser Konstellation ergeben sich keine signifikanten Unterschiede im Titerverlauf. Moxalactam hemmt das Wachstum von Streptococcus faecalis nur unzureichend; hier wurde die mangelnde Effektivität der Cephalosporine gegen Enterokokken deutlich (187). Die Titerstufen 1:2 waren ausgewachsen, so daß von einer bakteriziden Wirkung geringer als 1:2 ausgegangen wurde. Für Moxalactam ergibt sich deshalb theoretisch für die kombinierte Applikation eine signifikante Wirkungsverstärkung in allen 10 Fällen (P=0,001), auf eine mittlere MBK von 1:8,6 in der Kombination. Damit ergab sich gute Übereinstimmung unserer Ergebnisse mit den Versuchen von SKALOVA (188) und MALOTTKE (133), die in ihren Arbeiten eine geringe Empfindlichkeit von Streptococcus faecalis gegenüber Moxalactam feststellten. Die MHK-Werte lagen in ihren Untersuchungen über 64 mg/l. Für Azlocillin bestätigte sich die ausreichende Wirksamkeit gegen Enterokokken, die bei Konzentrationen von 1 - 2 mg/l (181) erreicht wurden. Zusammenfassend kann festgehalten werden, daß Moxalactam keine klinisch relevante Wirkung gegenüber Streptococcus faecalis zeigte; die Aktivität von Azlocillin gegen diesen Keim wurde durch Anwesenheit von Moxalactam, wie die absoluten MBK-Werte zeigen, nicht beeinflußt. Es ergaben sich ausreichende Serumtiter. Es lag in Anbetracht der offensichtlich nicht titrierbaren Aktivität von Moxalactam in der Kombi-

nation ein indifferenter Wirkungstyp vor.

Pseudomonas aeruginosa

Die MBK-Mittelwerte lagen bei 1:3,5 in der Einzel- und 1:3,7 in der kombinierten Applikation von Azlocillin. Dabei traten keine signifikanten Titeranstiege auf. Für Moxalactam lagen die MBK-Titer im Mittel bei 1:2,6 gegenüber 1:3,7 in der Kombination. Bei 2 signifikanten Titeranstiegen, in der Kombination von 1:1 auf 1:4 läßt sich hier keine eindeutige Aussage machen. Für Moxalactam und Azlocillin kann danach ein indifferenter Wirkungsmechanismus angenommen werden. GRIMM (228) untersuchte 1981 16 Stämme von Pseudomonas aeruginosa und fand bis auf wenige Ausnahmen nur indifferenten Wirkungstyp in der Kombination von Azlocillin mit Cefoxitin. NEUHAUS (148) untersuchte diverse Kombinationen von ß-Lactam-Antibiotika und beschrieb für Pseudomonas Species indifferente bis antagonistische Wirkung in der Mehrzahl der Fälle. Dabei stellte sich heraus, daß Antagonismus am häufigsten auftrat, wenn Cefoxitin in der Kombination vorhanden war. Auch für Carbenicillin bzw. Ampicillin mit Cephaloridin bzw. Cloxacillin wurde antagonistische Wirkung bekannt (225). Nur für wenige Kombinationen wie z.B. Cefotaxim mit Azlocillin ist synergistische Wirkung festgestellt worden (226). Pseudomonas Species liegen zwar im therapeutisch erreichbaren Bereich von Azlocillin (181) und Moxalactam (142, 188), ausreichende Titer ließen sich jedoch in unserem Versuchsansatz weder für die Einzel- noch für die kombinierte Anwendung sichern (33).

6-h-Werte

Enterobacter sakazakii

Die MBK-Werte für Azlocillin lagen im Mittel bei 1:2 gegenüber 1:7,5 in der Kombination mit Moxalactam. Es zeigten sich 6 signifikant höhere Titer in der Kombination (P=0,001).
Für Moxalactam ergaben sich Mittelwerte für die MBK von 1:5,2 bzw. 1:7,5 in der Kombination mit Azlocillin. Hier waren keine signifikanten Titeranstiege zu verzeichnen. Formell läge für die hier untersuchte Kombination ein additiver Wirkungstyp vor. Da jedoch Azlocillin in der Einzeldosierung in 4 von 10 Fällen nur unzureichende Hemmung des Keimwachstums zeigte (1:1

bzw. über 1:2), auf die sich die Signifikanz stützt, sollte besser von indifferenter Kombinationswirkung gesprochen werden.
Bemerkenswert scheint die Beobachtung, daß Azlocillin noch in Konzentrationen die weit unterhalb der MBK des Keimes von 32 mg/l liegen, eine titrierbare Aktivität gegen Enterobacter sakazakii erbrachte. Dieser Effekt war im Einzelfall nicht an überdurchschnittlich hohe Serumspiegel einiger Probanden gebunden. So hatte beispielsweise Proband No. 8 die zweitniedrigste Serumkonzentration zum Zeitpunkt 6 h von 6,6 mg/l, aber noch einen Aktivitätstiter von 1:4 (Tab. 25).

Klebsiella oxytoca

Die Titerstufen der Serumbakterizidie von Azlocillin lagen im Mittel bei 1:1,5 gegenüber 1:8 in der Kombination. In 8 Fällen ergab sich eine signifikante Wirkungssteigerung (P=0,001), die jedoch wie bei Enterobacter sakazakii wegen der unzureichenden Quantifizierbarkeit der geringen bakteriziden Wirkung von Azlocillin in der Einzeldosierung zurückhaltend bewertet wurde.
Für Moxalactam ergaben sich für die Einzel- und Kombinationsapplikationen nahezu gleichbleibende MBK-Werte von 1:7,5 bzw. 1:8.Der Wirkungsmechanismus ist in diesem Fall als indifferent anzusehen, es gelten die bei Enterobacter sakazakii unter ähnlichen Umständen angelegten Bewertungskriterien. Auch hier wirkt Azlocillin wieder in geringeren Konzentrationen als der MBK des Keimes bakterizid, die individuellen Serumkonzentrationen zeigen allerdings Korrelationen zwischen niedriger Serumkonzentration und schwacher Wachstumshemmung (Proband No. 1:4,9 mg/l bei Titerstufe 1:1), bzw. hoher Serumkonzentrationen und höherem Aktivitätstiter (Proband No. 8 = 9,8 mg/l Titerstufe 1:2).

E. coli

Für Azlocillin lagen die MBK-Werte im Mittel bei 1:3,7, gegenüber 1:4,6 in der Kombination, womit keine signifikante Änderung zu erkennen war. Die Verdünnungsstufen für Moxalactam lagen im Mittel für die Einzelapplikation wie für die kombinierte Applikation bei 1:4,6. Wegen der Geringfügigkeit dieser Unterschiede, sollte ein indifferenter Wirkungstyp zugrunde gelegt werden. Azlocillin weist bei den Enterobacteriaceae gegen E.coli

nach 6 h den vergleichsweise höchsten Bakterizidie-Titer auf. Es wirkt auch hier in niedrigeren Konzentrationen als der in den Vorversuchen festgestellten MBK bakterizid.

Proteus mirabilis

Die MBK-Werte lagen für Azlocillin im Mittel bei 1:2,1 gegenüber 1:4 in der Kombination. Zwei signifikante Titeranstiege zeigten sich in der Kombination, beide ergaben sich aus schwachen Wirkungen in der Einzeldosierung (kleiner als 1:2 bzw. 1:1). Bei Moxalactam lagen die MBK-Werte bis auf eine Ausnahme (Proband No. 9 mit 1:1) bei 1:4 (Mittelwert 1:3,5), gegenüber einheitlich 1:4 in der Kombination. Damit zeigte nur Proband No. 9 einen deutlichen Titeranstieg. Für den Probanden No. 4 korrelierte der geringe Bakterizidie-Titer für Azlocillin mit dem vergleichsweise niedrigsten Serumspiegel (6,2 mg/l) in dieser Reihe (Tab. 26). Insgesamt lag ein indifferenter Wirkungstyp vor.

Streptococcus faecalis

Für Azlocillin gibt es in der Serumbakterizidie in der Kombination mit Moxalactam keine Wirkungsverstärkung gegenüber der Einzelapplikation. Die MBK liegt jeweils bei 1:4. Moxalactam ist gegen Streptococcus faecalis völlig unwirksam. Die Titerstufen sind hier einheitlich voll ausgewachsen. Bemerkenswert scheint hier wieder die Tatsache, daß Azlocillin eine durchgängig titrierbare Aktivität von 1:4, bei einer durchschnittlichen Serumkonzentration von 9,4 mg/l weit unterhalb der MBK des Keimes von 64 mg/l zeigt. Die bakterizide Aktivität wird in der Kombination augenscheinlich von Azlocillin getragen. Der Wirkungsmechanismus ist indifferent.

Pseudomonas aeruginosa

Nach 6 Stunden reichte offensichtlich die mittlere Serumkonzentration des Azlocillins mit 9,4 mg/l nicht mehr aus, um noch eine hinreichende Aktivität gegenüber Pseudomonas aeruginosa (MBK 32 mg/l) zu entwickeln. Die Titerstufen im Reihenverdünnungstest wuchsen einheitlich bis zur geringsten Verdünnung aus. Ebenso konnte für Moxalactam keine Beeinflussung des Keimwachstums festgestellt werden. Auch die Kombination war dementsprechend unwirksam.

5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die kombinierte Applikation von Azlocillin und Moxalactam auf ihre serumbakterizide Wirkung und pharmakokinetischen Veränderungen im Vergleich zur Einzelgabe untersucht. In einer vergleichenden Studie wurde dabei im zwei-Wochen-Abstand 10 gesunden freiwilligen Probanden am ersten Versuchstag 5 g Azlocillin, am zweiten Tag 2 g Moxalactam und am dritten Versuchstag 5 g Azlocillin plus 2 g Moxalactam gleichzeitig über 15 Minuten infundiert. Die Serumkonzentration wurde darauf jeweils direkt nach der Infusion 5', 10', 20', 30', 45', 60', 90', 2 h, 3 h, 4 h, 6 h, 8 h und 10 h (12 h und 24 h bei Moxalactam) bestimmt. Die Substanzwiederfindung im Urin wurde innerhalb von 24 h fraktioniert gemessen. Als Zeitpunkte zur Bestimmung der Serum-Bakterizidie wurden 1 h und 6 h nach Abschluß der Infusion gewählt.
Die Bestimmung der Serumkonzentration erfolgte mit dem Agardiffusionstest. Teststämme waren Bacillus subtilis AT 6633 für Azlocillin bzw. E. coli 6311 für Moxalactam. Für die Bestimmung der Einzelkomponenten in der Kombination wurde für Azlocillin ein gegen Moxalactam resistenter Stamm Streptococcus faecalis 27047 verwendet. Für den Nachweis von Moxalactam wurde Azloscillin über eine dem Agar zugegebene β-Lactamase Typ II inaktiviert. Als Teststamm diente hier E. coli 6311. Die unteren Nachweisgrenzen lagen bei 0,15 mg/l für Bacillus subtilis mit Azlocillin und bei 1,2 mg/l für Streptococcus faecalis mit Moxalactam im Serum, bzw. 0,15 mg/l für beide Substanzen im Puffer.
Maximale Serumkonzentrationen wurden im Mittel mit 414 $\pm$ 87,7 mg/l für Azlocillin bzw. 416 $\pm$ 79,5 mg/l in der Kombination gefunden. Der Serumkonzentrationsverlauf zeigte keine signifikanten Abweichungen von der Einzelapplikation. Nach 6 h wurden 8,4 $\pm$ 2 mg/l bzw. 9,3 $\pm$ 3,3 mg/l in der Kombination gemessen. Bei Moxalactam lagen die Spitzenkonzentrationen mit 217 $\pm$ 27,4 mg/l gegenüber 210 $\pm$ 39,4 mg/l in der Kombination etwa gleich. Nach 10 h wurden mit 5,2 $\pm$ 1,6 mg/l bzw. 7,7 $\pm$ 2,4 mg/l in der Kombination ebenfalls keine signifikanten Unterschiede deutlich. Für Moxalactam waren Serumspiegel bis 24 h nach der Infusion mit 0,58 $\pm$ 0,05 mg/l nachweisbar. Die AUC war in der gemeinsamen Applikation für beide Substanzen erhöht. Sie stieg bei Azlocillin von 504 $\pm$ 41,7 auf 581 $\pm$ 12,3 mg x h/l; für Moxalactam war der Unterschied mit 421 $\pm$ 13,2 gegenüber 505 $\pm$ 13,1 mg x h/l ebenso deutlich.

Auch die totale Clearance fiel jeweils von 186 ± 30 auf 143 ± 20 ml/min bei Azlocillin und von 79 ± 2 auf 66 ± 1 ml/min bei Moxalactam. Die Halbwertszeit (t 1/2 β) verlängerte sich nur für Moxalactam von 135 ± 5 auf 173 ± 12 min. Bei Azlocillin konnte ein abnehmendes Verteilungsvolumen im steady state (Vd_{ss}) von 18,1 ± 2,5 auf 14,2 ± 0,2 l/100 kg festgestellt werden. Die Wiederfindung im Urin innerhalb von 24 h blieb für beide Substanzen annähernd gleich. Sie betrug für Azlocillin 54,6 ± 11,3 bzw. 58,3 ± 13% und für Moxalactam 80,4 ± 22,4 bzw. 80,3 ± 13,5%.
Eine gegenseitige Beeinflussung bei der Elimination konnte damit nicht eindeutig in der für Probenecid bekannten Weise festgestellt werden. Hinweise für Interferenzen extrarenaler Eliminationsmechanismen könnten jedoch vorliegen.

Für die Bestimmung der Serum-Bakterizidie wurden Verdünnungsreihen der Probandenseren im Mikrotitrationsverfahren angesetzt. Dabei wurde in Verdünnungsstufen von 1:2 bis 1:16 die Aktivität gegen E. coli Klebsiella oxytoca, Enterobacter sakazakii, Proteus mirabilis, Pseudomonas aeruginosa und Streptococcus faecalis untersucht. Serum-Bakterizidie wurde bei einer Abtötungsrate von 99,9% festgelegt. Bei diesen Bestimmungen konnten additive Wirkungssteigerungen nur für Enterobacter sakazakii und Klebsiella oxytoca 1 h nach der Infusion nachgewiesen werden. Hier wurden in beiden Fällen bakterizide Titer in der Kombination noch bei Verdünnungen von 1:14,9 gegenüber 1:4 (Azlocillin) und 1:7,3 (Moxalactam) bei Enterobacter sakazakii, bzw. 1:4 (Azlocillin) und 1:8 (Moxalactam) bei Klebsiella oxytoka festgestellt. Für Proteus mirabilis, E. coli, Pseudomonas aeruginosa und Streptococcus faecalis galt ein indifferenter Wirkungstyp. Therapeutisch relevante Bakterizidie Titer wurden bis auf Klebsiella oxytoca (Moxalactam 1:8) und Streptococcus faecalis (Azlocillin 1:8) nur in der Kombination erreicht. Nach 6 h waren bis auf Klebsiella oxytoca (Kombination 1:8) die Titerstufen für alle Keime unter 1:8 abgefallen. Die Kombination wirkte in allen Fällen indifferent. Ein Antagonismus konnte in keinem Ansatz nachgewiesen werden.

Tabelle 1 Serumkonzentrationen (mg / l) von AZLOCILLIN nach Infusion von 5g / 15 Min.

Proband	leer	0	5	10	20	30	45	60	90	2h	3h	4h	6h	8h	10h
1 U. G.	0.15	398	268	210	205	135	117	86.3	75.6	47.9	25.9	14.3	4.9	1.6	0.68
2 H. K.	0.15	313	291	265	210	199	177	144	106	78.8	51.8	31.2	11.6	4.7	1.85
3 B. K.	0.15	366	308	239	216	176	168	135	106	81.1	48.0	30.2	9.7	3.2	0.96
4 K. H.	0.15	538	458	358	305	225	193	167	125	84.6	39.4	21.4	6.2	2.5	0.75
5 U. M.	0.15	421	320	(286)	(238)	208	172	133	113	88.4	55.1	31.6	8.9	3.8	1.38
6 M. P.	0.15	444	306	274	232	175	157	116	92.2	74.0	37.1	(23.0)	8.4	3.4	1.56
7 G. R.	0.15	425	310	296	250	206	155	129	105	83.8	50.8	31.6	8.4	2.7	1.22
8 J. S.	0.15	284	260	213	180	171	142	117	97.0	77.5	44.7	26.3	6.6	2.6	1.19
9 R. S.	0.15	538	433	375	267	220	187	156	119	92.1	55.3	36.7	9.8	6.2	1.48
10 A. W.	0.15	(425)	401	370	335	275	220	166	135	92.3	50.8	33.9	9.4	3.5	1.35
M. W.	0.15	414	335	288	244	199	168	134	107	80.0	45.9	28.6	8.4	3.4	1.24
S. D. ±		87.7	69.5	65.3	50.3	38.0	28.6	25.0	17.5	12.8	9.3	6.9	2.0	1.3	0.36

Werte in Klammern wurden aus der Kurve extrapoliert

Tabelle 2 Serumkonzentrationen (mg / l) von AZLOCILLIN nach Infusion von 5g / 15 Min. in Gegenwart von MOXALACTAM 2 g

Proband	leer	0	5	10	20	30	45	60	90	2h	3h	4h	6h
1 U.G.	1.2	411	308	253	213	187	151	130	90.6	67.1	36.1	18.6	6.4
2 H.K.	1.2	338	(309)	(284)	254	235	212	184	135	102	64.1	34.6	6.5
3 B.K.	1.2	468	366	348	291	228	192	168	139	106	64.1	37.1	6.8
4 K.H.	1.2	605	416	370	325	280	211	172	122	83.9	50.4	32.9	12.3
5 U.M.	1.2	(360)	326	289	246	225	181	162	122	94.7	54.6	35.6	12.6
6 M.P.	1.2	397	346	263	218	177	159	144	115	97.4	54.6	33.0	8.8
7 G.R.	1.2	417	397	367	307	274	235	195	142	111	68.0	35.1	6.0
8 J.S.	1.2	385	297	270	218	184	155	130.	99.5	78.6	49.5	30.0	13.3
9 R.S.	1.2	416	366	319	277	225	178	151	111	89.5	51.3	29.8	14.2
10 A.W.	1.2	(370)	346	328	280	256	212	183	129	88.9	51.9	26.7	6.4
M.W.	1.2	416	347	312	263	227	189	162	120	91.9	54.4	31.2	9.3
S.D. ±		79.5	41.8	45.1	39.3	36.1	28.4	22.8	16.9	13.2	9.2	5.4	3.3

Werte in Klammern wurden aus der Kurve extrapoliert

Tabelle 3 Serumkonzentrationen (mg / l) von MOXALACTAM nach Infusion von 2 g / 15 Min.

Proband	leer	0	5	10	20	30	45	60	90	2h	3h	4h	6h	8h	10h
1 U.G.	0.3	187	158	128	107	88.7	76.7	65.4	55.2	47.0	34.2	24.0	14.1	7.0	3.7
2 H.K.	0.3	232	186	162	130	121	112	95.0	75.6	62.7	46.5	36.4	21.6	11.3	6.5
3 B.K.	0.3	227	174	155	124	113	103	84.4	70.0	64.4	51.6	43.3	21.6	13.1	7.3
4 K.H.	0.3	238	184	151	126	113	99.7	86.7	68.2	54.2	38.2	26.6	11.8	5.9	2.7
5 U.M.	0.3	211	174	149	123	106	99.7	70.6	60.9	49.5	38.3	27.0	14.1	7.2	3.3
6 M.P.	0.3	175	146	123	106	95.3	80.2	78.4	65.1	56.1	44.5	32.1	18.5	10.9	5.6
7 G.R.	0.3	243	225	207	184	156	127	111	82.5	73.1	56.0	43.7	25.5	15.6	8.8
8 J.S.	0.3	166	147	137	108	98.0	83.0	75.7	60.8	56.1	41.9	29.5	15.6	8.3	5.2
9 R.S.	0.3	246	187	150	(125)	112	100	95.1	78.9	64.9	47.3	33.0	16.8	8.5	4.3
10 A.W.	0.3	249	222	187	133	118	102	95.1	83.5	64.9	48.8	34.7	19.1	9.1	5.2
M.W.	0.3	217	180	155	127	113	99.7	85.8	70.0	59.2	44.7	34.0	17.8	9.6	5.2
S.D. ±		27.4	24.2	22.8	21.1	16.9	14.2	12.3	8.7	7.1	5.9	5.2	3.7	2.6	1.6

Werte in Klammern wurden aus der Kurve extrapoliert

Tabelle 4

Serumkonzentrationen (mg / l) von MOXALACTAM nach Infusion von 2 g / 15 Min. in Gegenwart von AZLOCILLIN 5 g

Proband	leer	0	5	10	20	30	45	60	90	2h	3h	4h	6h	8h	10h	12h	24h
1 U. G.	0.3	257	167	154	123	115	97.6	92.9	74.8	60.7	42.8	34.5	21.8	10.6	7.9	4.3	0.56
2 H. K.	0.3	159	(152)	148	137	128	121	91.9	85.7	70.3	54.1	37.8	22.2	14.1	9.9	6.6	0.69
3 B. K.	0.3	235	208	163	136	120	109	101	88.9	77.7	61.0	42.8	29.0	16.5	12.0	6.5	0.65
4 K. H.	0.3	264	208	184	164	139	114	101	80.5	62.2	46.0	33.3	19.4	10.5	4.4	2.4	0.59
5 U. M.	0.3	(193)	184	141	131	117	105	97.2	84.7	72.9	57.6	41.6	24.9	11.7	6.5	3.0	0.56
6 M. P.	0.3	180	169	126	117	104	93.2	84.2	72.4	60.6	42.7	34.6	27.3	14.1	8.0	5.2	0.54
7 G. R.	0.3	181	169	156	148	130	115	101	86.0	77.6	58.3	48.7	37.1	18.9	10.2	7.7	0.58
8 J. S.	0.3	198	157	140	127	120	104	92.9	77.3	66.1	48.3	37.8	23.5	13.2	6.4	3.9	0.56
9 R. S.	0.3	238	207	163	140	131	117	110	104	74.8	48.9	32.1	21.1	9.3	4.5	2.2	0.52
10 A. W.	0.3	(200)	173	159	146	133	117	110	95.8	82.0	56.3	45.1	25.4	14.2	7.8	4.9	0.56
M. W.	0.3	210	179	152	138	124	109	98.4	85.0	70.4	51.6	38.3	25.1	13.3	7.7	4.6	0.58
S. D. ±		39.4	19.9	18.6	13.5	10.4	9.2	8.3	9.7	7.7	6.8	5.5	5.1	2.9	2.4	1.8	0.05

Werte in Klammern wurden aus der Kurve extrapoliert

Tabelle 5 Serumkonzentrationen (mg / l) von AZLOCILLIN nach Infusion von 5g / 15Min.

HPLC -Methode

Proband	leer	0	5	10	20	30	45	60	90	2h	3h	4h	6h	8h	10h
1 U.G.	0	402	282	241	202	172	129	109	65.1	44.2	30.5	11.0	3.6	1.9	(0.7)
2 H.K.	0	306	267	238	202	187	164	120	87.6	72.1	45.0	25.6	11.7	5.8	2.2
3 B.K.	0	395	336	268	235	205	172	159	117	90.6	53.6	25.7	10.9	3.4	0.7
4 K.H.	0	601	434	384	335	288	195	179	119	85.6	41.7	17.9	8.5	2.1	(0.7)
5 U.M.	0	442	295	(270)	(240)	226	167	140	104	75.3	47.2	27.7	6.1	2.9	(0.9)
6 M.P.	0	478	369	331	252	214	190	143	111	87.1	37.2	(22.0)	7.3	1.6	0.9
7 G.R.	0	405	336	277	246	229	169	140	107	82.0	42.5	24.8	7.6	2.2	1.0
8 J.S.	0	338	279	244	223	177	139	130	97.4	74.1	36.1	20.5	6.9	1.1	0.9
9 R.S.	0	529	432	379	292	245	222	192	120	94.8	56.1	28.8	6.5	1.6	(0.4)
10 A.W.	0	(530)	488	411	321	298	252	166	131	96.8	68.8	35.1	12.7	3.2	1.6
M.W.		433	352	308	256	224	180	148	106	80.2	45.9	24.1	8.2	2.6	1.0
S.D. ±		92.2	76.9	68.8	49.2	43.2	36.8	26.2	19.0	15.2	11.2	6.9	2.8	1.3	0.5

Werte in Klammern wurden aus der Kurve extrapoliert

Tabelle 6 Serumkonzentrationen (mg / l) von AZLOCILLIN nach Infusion von 5g / 15 Min. in Gegenwart von MOXALACTAM 2g HPLC -Methode

Proband	leer	0	5	10	20	30	45	60	90	2h	3h	4h	6h	8h	10h
1 U.G.	0	524	355	312	258	227	169	146	97.7	73.2	40.1	20.7	5.1	1.5	0.5
2 H.K.	0	382	(353)	(328)	267	239	227	184	130	138	64.9	38.7	15.3	1.2	(0.1)
3 B.K.	0	498	408	368	320	243	221	189	153	110	60.4	36.9	14.6	3.2	(0.7)
4 K.H.	0	599	452	399	339	284	204	165	127	89.2	46.3	23.6	8.9	2.8	(1.0)
5 U.M.	0	(355)	342	325	281	215	196	162	113	88.4	54.5	25.3	7.6	3.4	2.1
6 M.P.	0	453	293	261	227	195	155	139	116	94.0	53.0	35.4	8.6	4.8	2.8
7 G.R.	0	479	431	376	303	270	245	208	152	114	62.8	40.7	13.7	2.5	0.6
8 J.S.	0	426	344	327	260	210	169	143	101	76.2	44.6	25.6	7.1	1.6	0.3
9 R.S.	0	409	356	287	238	228	177	154	96.4	71.8	41.1	21.0	6.6	1.5	(0.3)
10 A.W.	0	(360)	349	332	274	239	230	156	123	85.4	42.9	28.2	7.8	1.1	0.7
M.W.		448	368	331	277	235	199	164	121	91.1	51.1	29.6	9.5	2.4	0.9
S.D. ±		78.0	47.8	41.2	35.2	26.7	30.8	22.3	20.6	15.5	9.3	7.6	3.6	1.1	0.8

Werte in Klammern wurden aus der Kurve extrapoliert

Tabelle 7 Serumkonzentrationen (mg / l) von MOXALACTAM nach Infusion von 2g / 15 Min.

HPLC -Methode

Proband	leer	0	5	10	20	30	45	60	90	2h	3h	4h	6h	8h	10h
1 U.G.	1.59	251	188	176	138	114	88.2	76.6	76.5	61.6	43.3	26.6	14.8	10.6	4.4
2 H.K.	1.5	239	219	186	157	(139)	115	100	79.1	67.2	47.2	36.7	24.6	15.3	10.4
3 B.K.	7.1	239	192	173	145	129	117	94.3	82.4	68.7	53.8	41.4	27.4	15.9	11.9
4 K.H.	5.2	226	179	134	129	112	94.0	82.3	62.9	51.2	33.2	22.6	13.7	8.2	4.5
5 U.M.	1.0	201	153	130	120	104	88.6	77.8	63.8	54.1	34.9	25.6	13.1	6.1	3.1
6 M.P.	4.6	178	152	128	121	102	89.4	78.8	65.8	56.5	40.5	(32.0)	19.8	11.8	8.0
7 G.R.	6.3	223	200	192	148	128	117	102	88.2	73.2	56.4	42.8	27.3	18.5	10.7
8 J.S.	22.9	161	149	136	124	111	94.7	82.0	77.8	62.6	41.8	32.0	20.5	14.6	8.1
9 R.S.	4.0	212	145	133	(124)	115	93.4	90.7	80.5	64.8	49.8	38.4	25.4	20.8	17.1
10 A.W.	4.0	204	181	145	119	102	93.4	81.8	66.6	53.7	41.3	30.1	17.2	10.9	3.7
M.W.		213	177	153	132	115	99.2	86.7	74.4	61.4	44.2	32.8	20.4	13.3	8.7
S.D. ±		28.4	25.4	25.3	13.5	12.5	12.4	9.5	8.8	7.3	7.5	6.8	5.5	4.5	4.1

Werte in Klammern wurden aus der Kurve extrapoliert

Tabelle 8 Serumkonzentrationen (mg / l) von MOXALACTAM nach Infusion von 2g / 15Min. in Gegenwart von AZLOCILLIN 5 g HPLC -Methode

Proband	leer	0	5	10	20	30	45	60	90	2h	3h	4h	6h	8h	10h	12h	24h
1 U. G.	0	269	180	170	138	131	102	95.8	81.4	67.4	49.7	33.6	18.4	13.2	8.6	6.0	
2 H. K.	0	173	(167)	151	138	138	128	108	86.4	68.7	48.7	40.7	28.8	15.7	10.0	7.8	
3 B. K.	0	247	207	180	162	125	125	119	109	84.5	64.9	50.5	32.5	19.8	12.0	6.9	
4 K. H.	0	248	193	173	153	136	113	97.5	80.8	60.2	43.3	30.9	17. 1	10.0	5.9	1.9	
5 U. M.	0	(185)	168	146	121	109	102	103	81.1	71.8	51.9	37.9	20.4	10.8	7.5	2.3	
6 M. P.	0	212	(168)	151	141	110	103	98.9	81.3	64.4	53.6	41.1	24.5	14.8	9.1	5.8	
7 G. R.	0	180	174	173	149	124	112	99.4	81.9	73.2	60.9	49.5	18.3	12.5	6.8	11.0	
8 J. S.	0	191	163	143	132	112	96.1	85.7	72.0	59.5	46.6	36.0	20.4	14.6	7.2	3.7	
9 R. S.	0	194	162	135	130	127	102	98.9	71.5	64.3	45.1	35.3	15.1	6.6	5.3	3.2	
10 A. W.	0	190	162	151	134	131	111	98.3	84.3	68.3	52.2	43.5	24.9	13.6	6.5	4.0	
M. W.		209	174	157	140	124	109	100	83.0	68.2	51.7	39.9	22.0	13.1	7.9	5.2	
S. D. ±		33.8	15.1	15.1	11.9	10.6	10.6	8.4	10.5	7.2	6.7	6.4	5.5	3.5	2.0	2.8	

Werte in Klammern wurden aus der Kurve extrapoliert

Tabelle 9 Urinwiederfindung von 5 g AZLOCILLIN in 24 h

	0-4 h			4-8 h			8-12 h			12-24 h			0-4 h	0-8 h	0-12 h	0-24 h
Proband	mg/l	ml	mg	mg/l	ml	mg	mg/l	ml	mg	mg/l	ml	mg	%	%	%	%
1 U.G.	4270	370	1579	876	410	359	73	270	19	10	900	9	31.6	38.7	39.1	39.3
2 H.K.	1850	1250	2362	2240	230	515	66	880	58	17	1320	23	47.2	57.5	58.7	59.2
3 B.K.	5460	340	1856	1370	200	274	518	180	93	11	470	5	37.1	42.6	44.4	44.5
4 K.H.	4030	470	1894	3360	410	1377	1000	680	680	31	700	22	37.8	65.4	79.0	79.4
5 U.M.	6150	420	2583	1470	430	632	221	240	53	13	2000	27	51.6	64.3	65.3	65.8
6 M.P.	5940	310	1840	1380	370	510	285	530	151	15	1300	20	36.8	47.0	50.0	50.4
7 G.R.	4130	510	2106	1380	270	372	33	450	15	35	300	10	42.1	49.5	49.8	50.0
8 J.S.	1977	1140	2253	918	660	605	49	630	30	7	1150	8	45.0	57.0	57.6	57.8
9 R.S.	6950	290	2015	1080	270	291	383	310	118	17	1100	18	40.3	46.1	48.4	48.8
10 A.W.	6420	340	2182	1840	65	119	262	980	256	18	600	11	43.0	46.0	51.1	51.3
											M.W.		41.3	51.4	54.3	54.6
											S.D. ±		5.8	9.2	11.1	11.3

Tabelle 10 Urinwiederfindung von 5 g AZLOCILLIN in 24 h in Gegenwart von 2 g MOXALACTAM

Proband	0-4 h			4-8 h			8-12 h			12-24 h			0-4 h	0-8 h	0-12 h	0-24 h
	mg/l	ml	mg	mg/l	ml	mg	mg/l	ml	mg	mg/l	ml	mg	%	%	%	%
1 U.G.	6280	280	1758	1145	250	286	176	200	35	33	460	15	35.1	40.8	41.5	41.9
2 H.K.	3040	1000	3040	1572	350	550	77	1100	85	33	800	26	60.8	71.8	73.5	74.0
3 B.K.	11400	220	2508	1194	200	238	148	400	59	16	700	11	50.1	54.9	56.1	56.3
4 K.H.	11100	250	2775	1762	320	563	98	700	68	18	500	9	55.5	66.7	68.1	68.3
5 U.M.	6560	350	2296	2320	290	672	178	250	44	16	800	13	45.9	59.3	60.2	60.5
6 M.P.	5920	330	1953	1384	360	498	276	800	220	35	600	21	39.0	49.0	53.4	53.6
7 G.R.	1690	750	1267	0	0	0	2135	500	1067	117	500	58	25.5	25.5	46.6	47.8
8 J.S.	1325	1070	1417	988	470	464	182	400	72	33	500	16	28.3	37.6	39.2	39.6
9 R.S.	7150	500	3575	1780	50	89	520	450	234	11	700	8	71.5	73.2	77.9	78.1
10 A.W.	3120	850	2652	638	750	478	79	500	39	7	750	5	53.0	62.5	63.2	63.3
											M.W.		47.0	51.6	57.9	58.3
											S.D. ±		14.6	14.5	7.6	13.0

Tabelle 11 Urinwiederfindung von 2 g MOXALACTAM in 24 h

Proband	0-4 h			4-8 h			8-12 h			12-24 h			0-4 h	0-8 h	0-12 h	0-24 h
	mg/l	ml	mg	mg/l	ml	mg	mg/l	ml	mg	mg/l	ml	mg	%	%	%	%
1 U. G.	5660	280	1584	1120	220	246	316	170	53	62	220	13	79.2	91.5	94.1	94.8
2 H. K.	2260	520	1175	904	280	253	287	280	80	23	2700	64	58.7	71.4	75.4	78.6
3 B. K.	5860	180	1054	636	350	211	0	0	0	75	500	37	52.7	63.2	63.2	65.1
4 K. H.	2070	400	828	1780	290	516	420	620	260	67	500	33	41.4	67.2	80.2	81.8
5 U. M.	1870	700	1309	1090	380	414	156	390	60	16	830	13	65.4	86.1	89.1	89.8
6 M. P.	7580	130	985	1210	260	314	363	150	54	30	720	22	49.2	64.9	67.6	68.7
7 G. R.	1400	530	742	2140	480	1027	158	300	47	31	1100	34	37.1	88.5	90.8	92.5
8 J. S.	1360	970	1319	616	420	258	193	240	46	54	780	42	65.9	78.8	81.1	83.2
9 R. S.	1230	780	936	1000	480	480	197	380	74	18	700	12	46.8	70.8	74.5	75.1
10 A. W.	3050	430	1311	410	380	155	75	100	7	46	650	30	65.5	73.3	73.7	75.2
												M. W.	56.1	73.0	79.0	80.4
												S. D. ±	13.3	10.6	15.4	22.4

Tabelle 12 Urinwiederfindung von 2 g MOXALACTAM 24 h in Gegenwart von 5 g AZLOCILLIN

Proband	0-4 h			4-8 h			8-12 h			12-24 h			0-4 h	0-8 h	0-12 h	0-24 h
	mg/l	ml	mg	mg/l	ml	mg	mg/l	ml	mg	mg/l	ml	mg	%	%	%	%
1 U.G.	3320	280	929	1455	250	363	474	200	94	121	460	55	46.4	64.6	69.3	72.0
2 H.K.	1245	1000	1245	955	350	348	81	1100	89	78	800	62	62.2	79.6	84 1	87.2
3 B.K.	5200	220	1144	1150	200	230	269	400	107	81	700	56	57.2	68.7	74.0	76.8
4 K.H.	5800	250	1450	1150	320	368	120	700	84	45	500	22	72.5	90.9	95.1	96.2
5 U.M.	3660	350	1281	1815	290	526	366	250	91	66	800	53	64.0	90.3	94.9	97.5
6 M.P.	2140	330	706	945	360	340	250	800	200	61	600	36	35.3	52.3	62.3	64.1
7 G.R.	970	750	727	0	0	0	1370	500	688	87	500	43	36.3	36.3	70.7	72.9
8 J.S.	670	1070	716	814	470	382	238	400	95	69	500	34	35.8	54.9	59.6	61.3
9 R.S.	3170	500	1585	1700	50	85	571	450	256	33	700	23	79.2	83.5	96.3	97.4
10 A.W.	1310	850	1113	456	750	342	126	500	63	49	750	36	55.6	72.7	75.9	77.7
												M.W.	55.6	69.3	78.2	80.3
												S.D. ±	15.6	14.2	13.6	13.5

Tabelle 13 Urinwiederfindung von 5 g AZLOCILLIN in 24 h HPLC-Methode

	0-4 h			4-8 h			8-12 h			12-24 h			0-4 h	0-8 h	0-12 h	0-24 h
Proband	mg/l	ml	mg	mg/l	ml	mg	mg/l	ml	mg	mg/l	ml	mg	%	%	%	%
1 U.G.	4236	370	1567	661	410	271	91	270	24	10	900	9	31.3	36.8	37.3	37.4
2 H.K.	1952	1250	2439	1559	230	358	60	880	53	17	1320	22	48.8	56.0	57.0	57.5
3 B.K.	6386	340	2171	1109	200	221	378	180	68	14	470	6	43.4	47.9	49.2	49.4
4 K.H.	3968	470	1864	3568	410	1463	1045	680	710	24	700	17	37.3	66.6	80.8	81.1
5 U.M.	6617	420	2778	1155	430	496	291	240	70	12	2000	24	55.6	65.5	66.9	67.4
6 M.P.	7674	310	2378	1811	370	670	329	530	174	15	1300	20	47.6	67.0	64.5	64.9
7 G.R.	3464	510	1766	1109	270	299	22	450	10	21	300	6	35.3	41.3	41.5	41.6
8 J.S.	2039	1140	2324	1043	660	688	66	630	42	7	1150	8	46.5	60.3	61.1	61.3
9 R.S.	6114	290	1773	824	270	222	329	310	102	15	1100	16	35.5	39.9	42.0	42.3
10 A.W.	5677	340	1930	1964	65	127	236	980	232	19	600	11	38.6	41.2	45.8	46.0
											M.W.		41.9	51.6	54.6	54.8
											S.D. ±		7.5	11.4	13.8	13.9

Tabelle 14 Urinwiederfindung von 5 g AZLOCILLIN in 24 h HPLC-Methode

in Gegenwart von 2 g MOXALACTAM

Proband	0-4 h			4-8 h			8-12 h			12-24 h			0-4 h	0-8 h	0-12 h	0-24 h
	mg/l	ml	mg	mg/l	ml	mg	mg/l	ml	mg	mg/l	ml	mg	%	%	%	%
1 U.G.	6639	280	1859	1279	250	319	174	200	34	34	460	15	37.2	43.6	44.3	44.6
2 H.K.	2822	1000	2822	1394	350	488	77	1100	84	26	800	21	54.4	66.2	67.9	68.3
3 B.K.	11894	220	2616	1122	200	224	140	400	56	10	700	7	52.3	56.8	57.9	58.1
4 K.H.	10302	250	2575	1679	320	537	95	700	66	11	500	6	51.5	62.3	63.6	63.7
5 U.M.	7681	350	2688	1949	290	565	135	250	33	7	800	5	53.8	65.1	65.8	65.9
6 M.P.	6119	330	2019	1685	360	606	274	800	219	19	600	11	40.4	52.5	56.9	57.1
7 G.R.	2400	750	1799	0	0	0	1937	500	968	84	500	42	36.0	36.0	55.4	56.2
8 J.S.	2329	1070	2492	859	470	403	144	400	57	24	500	12	49.8	57.9	59.1	59.3
9 R.S.	5486	500	2742	1733	50	86	365	450	164	11	700	8	54.8	56.6	59.9	60.0
10 A.W.	2193	850	1864	481	750	360	52	500	26	6	750	4	37.3	44.5	45.0	45.0
											M.W.		46.9	54.1	57.5	57.8
											S.D. ±		8.2	9.9	7.8	7.8

Tabelle 15 Urinwiederfindung von 2 g MOXALACTAM in 24 h HPLC-Methode

Proband	0-4 h			4-8 h			8-12 h			12-24 h			0-4 h	0-8 h	0-12 h	0-24 h
	mg/l	ml	mg	mg/l	ml	mg	mg/l	ml	mg	mg/l	ml	mg	%	%	%	%
1 U.G.	5065	280	1418	1322	220	290	330	170	56	54	220	12	70.9	85.4	88.2	88.8
2 H.K.	2392	520	1243	1187	280	332	308	280	86	35	2700	94	62.1	78.8	83.1	87.8
3 B.K.	6651	180	1197	750	350	262	0	0	0	60	500	30	59.8	73.0	73.0	74.5
4 K.H.	1944	400	778	1988	290	576	446	620	276	56	500	28	38.9	67.7	81.6	83.0
5 U.M.	1651	700	1156	1051	380	399	174	390	67	24	830	20	57.8	77.8	81.2	82.2
6 M.P.	7911	130	1028	1451	260	377	414	150	62	55	720	39	51.4	70.2	73.4	75.3
7 G.R.	1422	530	753	1987	480	953	160	300	48	22	1100	24	37.6	85.4	87.8	89.0
8 J.S.	1209	970	1173	733	420	307	244	240	58	73	780	57	58.6	74.0	77.0	79.8
9 R.S.	1408	780	1098	0	480	411	154	380	58	33	700	23	54.9	75.4	78.4	79.6
10 A.W.	2851	430	1226	538	380	204	55	100	5	68	650	44	61.3	71.5	71.8	74.0
												M.W.	55.3	75.9	79.6	81.4
												S.D. ±	10.3	6.0	5.9	5.8

Tabelle 16 Urinwiederfindung von 2g MOXALACTAM in 24 h HPLC Methode
in Gegenwart von 5 g AZLOCILLIN

Proband	0-4 h			4-8 h			8-12 h			12-24 h			0-4 h	0-8 h	0-12 h	0-24 h
	mg/l	ml	mg	mg/l	ml	mg	mg/l	ml	mg	mg/l	ml	mg	%	%	%	%
1 U.G.	3476	280	973	1508	250	377	482	200	96	88	460	40	48.7	67.5	72.3	74.4
2 H.K.	1078	1000	1078	1025	350	359	101	1100	111	37	800	29	53.9	71.8	77.4	78.9
3 B.K.	5586	220	1228	1308	200	262	330	400	132	48	700	34	61.4	74.5	81.1	82.8
4 K.H.	5055	250	1264	1162	320	372	119	700	83	18	500	9	63.2	81.8	86.0	86.4
5 U.M.	3747	350	1311	2011	290	583	341	250	85	23	800	18	65.6	94.7	99.0	99.9
6 M.P.	2448	330	808	1000	360	360	336	800	269	139	600	83	40.4	58.4	71.8	76.0
7 G.R.	933	750	700	0	0	0	1588	500	794	246	500	123	35.0	35.0	74.7	80.9
8 J.S.	551	1070	590	732	470	344	276	400	110	98	500	49	29.5	46.7	52.2	54.7
9 R.S.	2895	500	1448	1397	50	70	478	450	251	21	700	15	72.4	75.9	88.5	89.2
10 A.W.	1064	850	904	497	750	373	167	500	83	41	750	31	45.2	63.9	68.0	69.6
												M.W.	51.5	68.7	77.1	79.3
												S.D. ±	14.1	17.2	12.7	12.1

Tabelle 17 Pharmakokinetische Parameter 5 g AZLOCILLIN 15 Min. Infusion

Proband	C_p^o mg/l	$t^{1}/_{2}$ ß min	V_{dss} l/100kg	V_{darea} l/100kg	AUC h x mg/l	Cl_{tot} l/min	Urin Ausscheidung % 24 h
1	559	76.8	16.5	20.9	441	0.188	39.3
2	366	87.5	17.3	19.1	550	0.151	59.2
3	470	92.5	40.1	60.5	183	0.453	44.5
4	487	76.7	12.7	17.0	541	0.153	79.4
5	614	79.4	15.2	16.6	572	0.145	65.9
6	578	85.7	15.5	18.7	549	0.151	50.4
7	423	77.6	19.8	22.1	421	0.197	50.0
8	461	78.4	16.5	17.4	540	0.154	57.8
9	776	84.8	13.1	15.3	663	0.125	48.8
10	460	78.5	13.8	16.2	582	0.143	51.3
MW	519	81.8	18.1	22.4	504	0.186	54.6
SD ±	36.9	1.7	2.5	4.3	41.7	0.030	11.1

Tabelle 18 Pharmakokinetische Parameter 2 g MOXALACTAM 15 Min. Infusion

Proband	C_p^o mg/l	$t^{1}/_{2}$ ß min	V_{dss} l/100kg	V_{darea} l/100kg	AUC h x mg/l	Cl_{tot} l/min	Urin Ausscheidung % 24 h
1	290	131	14.4	16.2	390	0.085	94.8
2	289	142	12.9	14.1	484	0.068	78.6
3	278	151	15.6	16.8	434	0.076	65.1
4	306	108	13.8	15.1	342	0.097	81.9
5	261	123	14.1	15.8	373	0.089	89.8
6	264	145	15.0	15.9	440	0.075	68.7
7	225	161	15.3	17.6	441	0.075	92.3
8	247	138	13.8	14.9	447	0.074	83.2
9	429	121	12.2	13.1	444	0.074	75.1
10	329	128	13.5	14.9	414	0.080	75.2
MW	292	135	14.0	15.4	421	0.079	80.4
SD ±	17.8	5.0	0.33	0.4	13.2	0.002	22.4

Tabelle 19 Pharmakokinetische Parameter 5 g AZLOCILLIN 15 Min. Infusion

in Gegenwart von 2 g MOXALACTAM

Proband	C_p^o mg/l	$t^{1}/_{2}$ ß min	V_{dss} l/100kg	V_{darea} l/100kg	AUC h x mg/l	Cl_{tot} l/min	Urin Ausscheidung % 24 h
1	718	68.3	13.4	14.9	549	0.151	41.9
2	719	68.3	13.5	14.9	549	0.151	74.0
3	609	70.4	13.6	14.4	588	0.141	56.3
4	595	84.8	13.4	16.7	607	0.137	68.3
5	434	82.5	15.3	16.3	606	0.137	60.3
6	739	77.8	14.2	15.2	613	0.135	53.8
7	343	64.2	14.5	14.5	529	0.157	47.8
8	568	91.5	15.3	17.3	634	0.131	39.6
9	498	92.0	15.2	18.1	610	0.136	78.1
10	349	64.0	14.3	14.5	528	0.157	63.3
MW	557	76.4	14.2	15.7	581	0.143	58.3
SD ±	46.7	3.42	0.25	0.41	12.3	0.003	13.0

Tabelle 20 Pharmakokinetische Parameter 2 g MOXALACTAM 15 Min. Infusion in Gegenwart von 5 g AZLOCILLIN

Proband	C_p^o mg/l	$t^{1}/_{2}$ ß min	V_{dss} l/100kg	V_{darea} l/100kg	AUC h x mg/l	Cl_{tot} l/min	Urin Ausscheidung % 24 h
1	412	150	12.0	13.2	548	0.060	72.0
2	173	219	15.3	19.8	531	0.062	87.2
3	298	172	14.8	15.9	521	0.063	76.8
4	274	129	12.1	14.6	425	0.078	96.2
5	167	208	12.3	19.3	520	0.064	97.5
6	249	168	14.7	15.8	512	0.065	64.1
7	161	175	17.6	18.5	456	0.073	72.9
8	281	145	11.8	12.4	562	0.059	61.3
9	241	124	11.7	12.1	492	0.067	97.4
10	152	237	14.7	23.4	487	0.068	77.7
MW	241	173	13.7	16.5	505	0.066	80.3
SD ±	25.7	12.5	0.6	1.1	13.1	0.001	13.5

	MOXALACTAM		AZLOCILLIN	
	MHK mg/l	MBK mg/l	MHK mg/l	MBK mg/l
Enterobacter sakazakii	0.25	2.	16.	32.
E. coli	0.25 / 0.5	0.5	8. / 16.	16.
Klebsiella oxytoca.	0.125	0.25	32.	32.
Proteus mirabilis	0.125	2.	16.	16.
Pseudomonas aeruginosa	64.	64.	32.	32.
Streptococcus faecalis	128.	128.	16.	64.

Tabelle 21 Minimale Hemmkonzentrationen und minimale Bakterizidiekonzentrationen der untersuchten Keime.

Tabelle 22 Serum Eigenbakterizidie Vorversuche

Proband	Enterobacter sakazakii		E. coli		Klebsiella oxytoca,		Proteus mirabilis		Pseudomonas aeruginosa		Streptococcus faecalis	
	MHK	MBK	MHK	MBK	MHK	MBK	MHK	MBK	MHK	MBK	MHK	MBK
1	1:4	1:1	1:4	1:1	0	0	0	0	1:2	0	0	0
2	1:4	1:2	1:1	1:1	0	0	0	0	1:1	0	0	0
3	1:4	1:2	1:1	1:1	0	0	0	0	1:1	0	0	0
4	1:4	1:4	1:4	1:4	0	0	0	0	1:1	0	0	0
5	1:4	1:1	1:4	1:1	0	0	0	0	1:2	0	0	0
6	1:4	1:1	1:4	1:1	0	0	0	0	1:2	0	0	0
7	1:4	1:1	1:4	1:4	0	0	0	0	1:2	0	0	0
8	1:2	1:4	1:2	1:2	0	0	0	0	1:1	0	0	0
9	1:4	1:1	1:4	1:4	0	0	0	0	1:1	0	0	0
10	1:4	1:1	1:4	1:4	0	0	0	0	1:1	0	0	0

Tabelle 23 Serum Bakterizidie: E. coli

1 h Bakterizidie							6 h Bakterizidie					
AZLOCILLIN 5 g 150 mg/l		MOXALACTAM 2 g 96 mg/l		AZLOCILLIN / MOXALACTAM 162 / 98 mg/l		Proband	AZLOCILLIN 5 g 9.4 mg/l		MOXALACTAM 2 g 20 mg/l		AZLOCILLIN / MOXALACTAM 9.3 / 25.2 mg/l	
MBK	MHK	MBK	MHK	MBK	MHK		MBK	MHK	MBK	MHK	MBK	MHK
1:16	1:16	1:4	1:4	1:8	1:16	1	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4	1:16
1:8	1:16	1:4	1:4	1:8	1:8	2	1:4	1:4	1:4	1:8	1:4	1:8
1:16	1:16	1:4	1:4	1:8	1:8	3	1:4	1:4	1:8	1:8	1:8	1:8
1:16	1:16	1:4	1:8	1:8	1:8	4	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4
1:4	1:4	1:8	1:8	1:8	1:8	5	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4
1:4	1:4	1:8	1:16	1:8	1:8	6	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4
1:4	1:4	1:4	1:8	1:16	1:16	7	1:4	1:4	1:8	1:8	1:4	1:4
1:4	1:4	1:8	1:8	1:8	1:16	8	1:2	1:2	1:4	1:4	1:4	1:4
1:8	1:8	1:8	1:16	1:16	1:16	9	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4
1:4	1:4	1:8	1:8	1:16	1:16	10	1:4	1:4	1:4	1:4	1:8	1:8
1:6.9	1:7.2	1:5.4	1:6.9	1:8.9	1:10.8	M.W. (ln x)	1:3.7	1:3.7	1:4.6	1:5	1:4.6	1:5.6

Tabelle 24 Serum Bakterizidie: Klebsiella oxytoca

1 h Bakterizidie							6 h Bakterizidie					
AZLOCILLIN 5 g 150 mg/l		MOXALACTAM 2 g 96 mg/l		AZLOCILLIN / MOXALACTAM 162 / 98 mg/l		Proband	AZLOCILLIN 5 g 9.4 mg/l		MOXALACTAM 2 g 20 mg/l		AZLOCILLIN / MOXALACTAM 9.3 / 5.2 mg/l	
MBK	MHK	MBK	MHK	MBK	MHK		MBK	MHK	MBK	MHK	MBK	MHK
1:4	1:4	1:8	1:8	1:16	1:16	1	1:1	1:1	1:8	1:8	1:8	1:16
1:4	1:4	1:8	1:8	1:16	1:16	2	1:1	1:2	1:8	1:8	1:8	1:8
1:4	1:4	1:4	1:8	1:16	1:16	3	1:1	1:2	1:8	1:8	1:8	1:8
1:4	1:4	1:8	1:16	1:16	1:16	4	1:1	1:1	1:4	1:4	1:8	1:8
1:4	1:4	1:8	1:16	1:16	1:16	5	1:2	1:2	1:8	1:8	1:8	1:8
1:4	1:4	1:8	1:8	1:16	1:16	6	1:1	1:1	1:8	1:8	1:8	1:8
1:4	1:4	1:16	1:16	1:16	1:16	7	1:2	1:2	1:8	1:8	1:8	1:8
1:4	1:4	1:4	1:8	1:16	1:16	8	1:2	1:2	1:8	1:8	1:8	1:8
1:4	1:4	1:16	1:16	1:16	1:16	9	1:4	1:4	1:8	1:8	1:8	1:8
1:4	1:4	1:8	1:8	1:8	1:8	10	1:4	1:4	1:8	1:8	1:8	1:8
1:4	1:4	1:8	1:10	1:14.9	1:14.9	M.W. (ln x)	1:1.5	1:1.8	1:7.5	1:7.5	1:8	1:8.5

Tabelle 25 Serum Bakterizidie: Enterobacter sakazakii

1 h Bakterizidie							6 h Bakterizidie						
AZLOCILLIN 5 g 150 mg/l		MOXALACTAM 2 g 96 mg/l		AZLOCILLIN / MOXALACTAM 162 / 98 mg/l		Proband	AZLOCILLIN 5 g 9.4 mg/l		MOXALACTAM 2 g 20 mg/l		AZLOCILLIN / MOXALACTAM 9.3 / 25.2 mg/l	
MBK	MHK	MBK	MHK	MBK	MHK		MBK	MHK	MBK	MHK	MBK	MHK
1:4	1:4	1:8	1:8	1:16	1:16	1	1:1	1:1	1:4	1:4	1:8	1:16
1:4	1:4	1:8	1:8	1:8	1:16	2	1:2	1:2	1:8	1:8	1:8	1:8
1:4	1:4	1:8	1:8	1:16	1:16	3	1:4	1:4	1:8	1:8	1:8	1:8
1:4	1:4	1:8	1:8	1:16	1:16	4	1:1	1:1	1:4	1:4	1:8	1:8
1:4	1:4	1:8	1:8	1:16	1:16	5	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4	1:8
1:4	1:4	1:4	1:4	1:16	1:16	6	1:1	1:1	1:8	1:8	1:8	1:8
1:4	1:4	1:8	1:8	1:16	1:16	7	1:1	1:1	1:8	1:8	1:8	1:8
1:4	1:4	1:8	1:8	1:16	1:16	8	1:4	1:4	1:4	1:4	1:8	1:8
1:4	1:4	1:8	1:8	1:16	1:16	9	1:4	1:4	1:4	1:4	1:8	1:8
1:4	1:4	1:8	1:8	1:16	1:16	10	1:2	1:4	1:4	1:4	1:8	1:16
1:4	1:4	1:7.3	1:7.3	1:14.9	1:16	M.W. (ln x)	1:2	1:2.3	1:5.2	1:5.2	1:7.5	1:10

Tabelle 26 Serum Bakterizidie: Proteus mirabilis

1 h Bakterizidie							6 h Bakterizidie					
AZLOCILLIN 5 g 150 mg/l		MOXALACTAM 2 g 96 mg/l		AZLOCILLIN / MOXALACTAM 162 / 98 mg/l		Proband	AZLOCILLIN 5 g 9.4 mg/l		MOXALACTAM 2 g 20 mg/l		AZLOCILLIN / MOXALACTAM 9.3 / 5.2 mg/l	
MBK	MHK	MBK	MHK	MBK	MHK		MBK	MHK	MBK	MHK	MBK	MHK
1:4	1:8	1:4	1:4	1:4	1:8	1	1:2	1:4	1:4	1:4	1:4	1:8
1:4	1:8	1:4	1:4	1:8	1:16	2	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4	1:8
1:4	1:8	1:4	1:4	1:8	1:16	3	1:2	1:4	1:4	1:4	1:4	1:8
1:8	1:8	1:4	1:4	1:8	1:16	4	1:1	1:4	1:4	1:4	1:4	1:8
1:8	1:8	1:4	1:4	1:8	1:16	5	1:2	1:4	1:4	1:4	1:4	1:8
1:8	1:8	1:4	1:4	1:8	1:16	6	1:2	1:4	1:4	1:4	1:4	1:8
1:4	1:8	1:4	1:4	1:8	1:16	7	1:2	1:4	1:4	1:4	1:4	1:8
1:4	1:8	1:4	1:4	1:8	1:16	8	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4	1:8
1:4	1:8	1:4	1:4	1:8	1:16	9	1:1	1:4	1:1	1:4	1:4	1:8
1:4	1:8	1:4	1:4	1:8	1:16	10	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4	1:8
1:4.9	1:8	1:4	1:4	1:7.5	1:14.9	M.W. (ln x)	1:2.1	1:4	1:3.5	1:4	1:4	1:8

Tabelle 27 Serum Bakterizidie : Streptococcus faecalis

1 h Bakterizidie							6 h Bakterizidie					
AZLOCILLIN 5 g 150 mg/l		MOXALACTAM 2 g 96 mg/l		AZLOCILLIN / MOXALACTAM 162 / 98 mg/l		Proband	AZLOCILLIN 5 g 9.4 mg/l		MOXALACTAM 2 g 20 mg/l		AZLOCILLIN / MOXALACTAM 9.3 / 25.2 mg/l	
MBK	MHK	MBK	MHK	MBK	MHK		MBK	MHK	MBK	MHK	MBK	MHK
1 : 8	1 : 8	1 : 1	1 : 1	1 : 8	1 : 8	1	1 : 4	1 : 4	1 : 1	1 : 1	1 : 4	1 : 4
1 : 8	1 : 8	1 : 1	1 : 1	1 : 8	1 : 8	2	1 : 4	1 : 4	1 : 1	1 : 1	1 : 4	1 : 4
1 : 8	1 : 8	1 : 1	1 : 1	1 : 8	1 : 8	3	1 : 4	1 : 4	1 : 1	1 : 1	1 : 4	1 : 4
1 : 8	1 : 8	1 : 1	1 : 1	1 : 8	1 : 8	4	1 : 4	1 : 4	1 : 1	1 : 1	1 : 4	1 : 4
1 : 8	1 : 8	1 : 1	1 : 1	1 : 8	1 : 8	5	1 : 4	1 : 4	1 : 1	1 : 1	1 : 4	1 : 4
1 : 8	1 : 8	1 : 1	1 : 1	1 : 16	1 : 16	6	1 : 4	1 : 4	1 : 1	1 : 1	1 : 4	1 : 4
1 : 8	1 : 8	1 : 1	1 : 1	1 : 8	1 : 8	7	1 : 4	1 : 4	1 : 1	1 : 1	1 : 4	1 : 4
1 : 8	1 : 8	1 : 1	1 : 1	1 : 8	1 : 8	8	1 : 4	1 : 4	1 : 1	1 : 1	1 : 4	1 : 4
1 : 8	1 : 8	1 : 1	1 : 1	1 : 8	1 : 8	9	1 : 4	1 : 4	1 : 1	1 : 1	1 : 4	1 : 4
1 : 8	1 : 16	1 : 1	1 : 1	1 : 8	1 : 8	10	1 : 4	1 : 4	1 : 1	1 : 1	1 : 4	1 : 4
1 : 8	1 : 9.3	1 : 1	1 : 1	1 : 8.6	1 : 8.6	M. W. (ln x)	1 : 4	1 : 4	1 : 1	1 : 1	1 : 4	1 : 4

Tabelle 28 Serum Bakterizidie: Pseudomonas aeruginosa

1 h Bakterizidie							6 h Bakterizidie					
AZLOCILLIN 5 g 150 mg/l		MOXALACTAM 2 g 96 mg/l		AZLOCILLIN / MOXALACTAM 162 / 98 mg/l		Proband	AZLOCILLIN 5 g 9.4 mg/l		MOXALACTAM 2 g 20 mg/l		AZLOCILLIN / MOXALACTAM 9.3 / 25.2 mg/l	
MBK	MHK	MBK	MHK	MBK	MHK		MBK	MHK	MBK	MHK	MBK	MHK
1 : 4	1 : 4	1 : 4	1 : 4	1 : 4	1 : 8	1	1 : 1	1 : 1	1 : 1	1 : 1	1 : 1	1 : 8
1 : 4	1 : 4	1 : 1	1 : 4	1 : 4	1 : 8	2	1 : 1	1 : 1	1 : 1	1 : 2	1 : 1	1 : 4
1 : 4	1 : 4	1 : 4	1 : 4	1 : 4	1 : 8	3	1 : 1	1 : 1	1 : 1	1 : 4	1 : 1	1 : 4
1 : 4	1 : 4	1 : 2	1 : 4	1 : 4	1 : 8	4	1 : 1	1 : 1	1 : 1	1 : 1	1 : 1	1 : 4
1 : 4	1 : 4	1 : 2	1 : 4	1 : 4	1 : 8	5	1 : 1	1 : 1	1 : 1	1 : 1	1 : 1	1 : 4
1 : 4	1 : 4	1 : 1	1 : 4	1 : 4	1 : 8	6	1 : 1	1 : 1	1 : 1	1 : 1	1 : 1	1 : 4
1 : 4	1 : 4	1 : 4	1 : 4	1 : 4	1 : 8	7	1 : 1	1 : 1	1 : 1	1 : 4	1 : 4	1 : 4
1 : 4	1 : 4	1 : 4	1 : 4	1 : 4	1 : 8	8	1 : 1	1 : 1	1 : 1	1 : 1	1 : 1	1 : 4
1 : 1	1 : 4	1 : 4	1 : 4	1 : 2	1 : 8	9	1 : 1	1 : 1	1 : 1	1 : 2	1 : 1	1 : 4
1 : 4	1 : 4	1 : 4	1 : 4	1 : 4	1 : 8	10	1 : 1	1 : 1	1 : 1	1 : 2	1 : 1	1 : 4
1 : 3.5	1 : 4	1 : 2.6	1 : 4	1 : 3.7	1 : 8	M.W. (ln x)	1 : 1	1 : 1	1 : 1	1 : 1.5	1 : 1.1	1 : 4.3

Tabelle 29 Blutchemische Voruntersuchungsergebnisse der zehn Probanden

Proband	GOT U/l	GPT U/l	alk. Phosphatase U/l	γ- GT U/l	Kreatinin mmol/l
U. G. 1	14	8	103	8	89
H. K. 2	9	7	75	13	90
B. K. 3	10	9	80	5	67
K. H. 4	9	11	119	9	110
U. M. 5	16	15	124	12	98
M. P. 6	8	12	67	21	89
G. R. 7	7	7	58	10	87
J. S. 8	9	11	105	6	99
R. S. 9	9	13	64	9	106
A. W. 10	10	14	62	15	87

Literaturverzeichnis

1) Abraham, E.P., Newton, G.G.F. (1955): Cephalosporin C, new antibiotic containing sulfa and D-alpha-amino-dipic-acid. Nature, 175, 548-549

2) Abraham, E.P., Olson, B.H., Newton, G.G.F., Schurmans, D.H., Schenk, J.R. (1955): Identidy of Cephalosporin N and Synematin B. Nature 176, 551-553

3) Acar, J.F. (1978): Synergy between antimicrobial agents-Introducy Remarks. Infection, 6, 5-8

4) Acar, J.F., Sabath, L.D., Ruch, P.A. (1975):Antagonism of antibacterial action of some penicillins by other penicillins and cephalosporins. J. clin. Invest., 55, 446-453

5) Adam, H. (1956): Säuglingsenteritis, Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart

6) Adam, D. (1972): Der aktive Einfluß von Faktoren des Wirtsorganismus auf die antimikrobielle Wirksamkeit von Chemotherapeutika. Habilitationsschrift, München

7) Adam, D., Bauer, W., Seitz, B., Voigt, J. (1979): Pharmakokinetische Untersuchungen mit Breitspektrum-Penicillin / Oxacillin - Kombinationen bei freiwilligen Probanden. Arzneimittelforschung, 29, 1769-1804

8) Anderson, E.T., Young, L.S., Hewitt, W.L., (1974): Effect of antibiotic synergism on outcome of gram negative sepsis. Proc. 14th Interscience Conf. on Antimicrob. Agents and Chemother., San Francisco

9) Anderson, E., Young, L., Hewitt, W.L. (1978): Antimicrobial synergism in the therapy of gram negative rod bacteriemia. Chemotherapy, 24, 45-54

10) Andrassy, K., Ritz, E., (1980): Führen Ureido-Penicilline zu Hämostasestörungen und hamorrhagischer Colitis? Therapiewoche, 30, 2777-2784

11) Andrassy, K., Trobisch, W., Ritz, E., (1973): Medikamentös induzierte hämorrhagische Diathese in der Urämie. Dtsche. Med. Woschr., 98, 2247 ff

12) Anhalt, J.P., Sabath, L.D., Barry, A.L., (1980): Bactericidal activity of antibiotics in combination and detection of β-lactamase production, in: Antibiotics in laboratory medicine, Victor Lorian, M.D. New York

13) Aronoff, G.R., Sloan, R.S., Luft, F.C. (1982): Pharmacokinetics of Moxalactam in patients with normal and impaired renal function. J. Infect. Dis., 145, 365-369

14) Aviami, A., Giamarellou, H., (1978): Comparative in vitro activity of Azlocillin and Carbenicillin against Pseudomonas aeruginosa. Proc. 1st Mediter. Congr. of Chemother., Madrid

15) Baily, W.R., Scott, E.G., (1970): Diagnostic Microbiology. 3rd ed., C.V. Mosby, St. Louis

16) Barry, A.L., Lasner, R.A., (1979): In vitro method for determining minimal lethal concentrations of antimicrobiell agents. Am. J. clin. Pathol., 71, 88-92

17) Reller, B.L., Schoenknecht, F.D., Margaret, A.K., Sherris, C., (1974): Antibiotic susceptibility testing of Pseudomonas aeruginosa: Selection of a control strain and criteria for magnesium and calcium content in media. J. Inf. Dis., 130, 454-463

18) Reller, B.L., Stratton, C.W., (1977): Serum dilution test for bactericidal activity: II Standardisation and correlation with antimicrobial assays and susceptibility tests. J. Inf. Dis., 136, 196-204

19) Batchelor, F.R., Doyle, F.D., Nayler, J.W.C., Rolinson, G.N., (1951): Synthesis of Penicillin, 6-amino-penicillanic acid in penicillum fermentations. Nature, 183, 257-258

20) Bauer, A.W., Kirby, W.M.M., Shirris, J.C., Turck, M., (1966): Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method, Am. J. clin. Path., 45, 493-496

21) Bennett, J.V., Brodie, J.L., Benner, E.J., Kirby, W.M.M., (1966): Simplified accurate method for antibiotic assay of clinical specimens. Appl. Microbiol., 14, 170-174

22) Berenbaum, M.C., (1978): Method for testing synergy with a number of agents. J. Infect. Dis., 137, 122-130

23) Bergan, T., (1981): Overview of acylureido-penicillin pharmacokinetics Scand. J. Infect. Dis. Suppl., 29, 33-48

24) Bergan, T., (1983): Review of the pharmacokinetics and dose dependency of Azlocillin in normal subjects and patients with renal insufficiency. J. Antimicrob. Chemother., 11, 101-114

25) Bergan, T., Thorsteinsen, S.B., Steingrimsson, O., (1982): Dose-dependent pharmacokinetics of Azlocillin compaired to Mezlocillin. Chemotherapy, 28, 160-170

26) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th Ed., William and Wilkins Company, Baltimore (1974)

27) Bolton, W.K., Scheld, W.M., Spyker, D.A., Overby, T.L., Sande, M.A., (1980): Pharmacokinetics of Moxalactam in subjects with various degrees of renal disfunction. Antimicrob. Agents and Chemother., 18, 933-938

28) Borner, K., Averdunk, R., (1970): Korrelation der Thromboplastinzeiten bei Dicumarol-behandelten Patienten unter Verwendung verschiedener Thrombokinase-Präparate. Zeitschr. f. klin. Pharm. u. klin. Biochemie, 8, 263-268

29) Borobio, M.V., Azuar, J., et al. (1980): Comparative in vitro activity of 1-oxa-/β-lactam and Cefoperazone with other antipseudomonal antimicrobial agents. Antimicrob. Agents Chemother., 17, 129-131

30) Braveny, J., (1981): Antibakterielle Wirkung der Kombinationen von /β-Lactam-Antibiotika in: Kombinationen von /β-Lactam-Antibiotika. Hersgb.: W. Stille, R. Elsser, Zuckschwerdt Verlag München

31) Braveny, J., Stille, W., Elsser, R., (1981): Kombinationen von /β-Lactam-Antibiotika, Arbeitstagung der Sektion antimikrobielle Chemotherapie der Paul-Ehrlich-Gesellschaft, Frankfurt, W. Zuckschwerdt-Verlag-München

32) Brotzu, G., (1948): Studies on new mycete, Lavori dell'Instituto di Igiene di Cagliari, 1

33) Carmine, A.A., Brogden, R.N., et al. (1983): Moxalactam: A review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use. Drugs, 26, 279-333

34) Charles, S. Bryan, M.d., et al., (1975): Gram-negative bacillary Endocarditis - Interpretation of the serum bactericidal test. Am. J. Med., 58, 209-215

35) Chattopadhyay, B., Hall, S., (1979): In vitro activity of Azlocillin against Pseudomonas. Lancet, 8112, 391, ff.

36) Chauvette, R.R., Flynn, E.H., Jackson, B.G., et al. (1962): Chemistry of Cephalosporin antibiotics: II Preparation of a new class of antibiotics and relation of structure and activity. J. Am. Chem. Soc., 84, 3401-3402

37) Cooke, E.M., (1974): Escherichia coli in man. Churchill Livingston, Edinburgh/London

38) Dasante, K.A., Israel, K.S., et al., (1982): Effect of Probenecid on the pharmacokinetics of Moxalactam. Antimicrob. Agents Chemother., 21, 58-61

39) Daschner, F., (1976): In vitro Kombinationswirkung von Carbenicillin, Mezlocillin und Azlocillin mit Gentamycin und Sisomycin auf Pseudomonas aeruginosa, Serratia marcensens, Klebsiella pneumoniae und indolpositiven Proteus. Infection, 4, 331-336

40) Daschner, F., (1979): Synergistic effects of Azlocillin and Mezlocillin with aminoglycosides in nosocomial infections. Infection, 7, Suppl. 3, 250-251

41) Delgado, F.A., Stout, R.L., Whelton, A., (1983): Pharmacokinetics of Azlocillin in normal renal function: single and repetitive dosing studies. J. Antimicrob. Chemother., 11, Suppl. B., 79-88

42) De Maria, A., Alvarez, J.R., Klein, J.O., Mc Cabe, W.R., (1980): In vitro studies of Moxalactam, a new /3-lactam-antibiotic with significant activity against gram-negative bacteria. Infection, 8, Suppl., 261-267

43) Dost, F.H., (1968): Grundlagen der Pharmakokinetik, II. Auflage, Thieme Verlag

44) Drews, J., (1979): Grundlagen der Chemotherapie, Springer Verlag

45) Düben, W., Helwing, E., Tettenborn, D., Förster, D., Pütter, J., (1979): Die biliäre Exkretion von Azlocillin, Fortschr. d. Med., 9, 419-421

46) Dutcher, B.S., Reynard, A.M., Beck, M.E., Cuninngham, R.K., (1978): Potentiation of antibiotic bactericidal activity by normal human serum. Antimicrob. Agents Chemother., 13, 820-826

47) Eagle, H., Musselman, A.D., (1948): The rate of bactericidal action of Penicillin in vitro as function of its concentration and its paradoxically reduced activity at high concentrations against certain organisms. J. Exp. Med., 88, 99-131

48) Edwards, J.R., Park, J.T., (1969): Correlation between growth inhibition and the binding of various Penicillins and Cephalosporins to Staphylococcus aureus. J. Bacteriology, 99, 459-462

49) Ehrlich, P., (1913): Chemotherapeutics: Scientific principles, methods and results. Lancet, 2, 445-447

50) Eickhoff, T.C., (1969): In vitro effects of Carbenicillin combined with Gentamycin and Polymyxin B against Pseudomonas aeruginosa. Appl. Microbiol., 18, 469-473

51) Errıcson, H.M., Sherris, J.G., (1971): Antibiotic susceptibility testing: Report of an international collaborative study. Acta Pathol. Microbiol. Scand., 217, 1-90

52) Feingold, D.S., Goldmann, J.N., Kuritz, H.N., (1968): Locus of the action of serum and the role of Lysozym in the serum bactericidal reaction. J. Bacteriology, 96, 2118-2131

53) Fierer, J., Finley, F., Brande, A.L., (1972): A plaque assay on agar for detection of gram negative bacilli sensitive to complement. J. Immunology, 109, 156 ff

54) Finn, H., (1980): Pharmaka-Portrait: Mezlocillin kombiniert mit Oxacillin. Selekta, 4

55) Fleming, A., (1929): On the bacterial action of cultures of Penicillum with special reference to their use in the isolation of B. influenzae, Brit. J. Exp. Pathol., 10, 226-236

56) Fliegel, P., Becker, K., (1978): Pharmakokinetics of Azlocillin in persons with normal and impaired renal functions. Antimicrob. Agents Chemother., 14, 288-291

57) Florey, H.W., (1946): The use of microorganisms for therapeutic purposes. Yale J. Biol. and Med., 19, 101-118

58) Flournoy, D.J., Perrymann, F.A., (1979): LY 127935, a new β-lactam-antibiotic versus Proteus, Klebsiella, Serratia and Pseudomonas. Antimicrob. Agents Chemother., 16, 641-643

59) Fort, W., Henschler, D., Rummel, W., (1977): Pharmakologie und Toxikologie, 2. Auflage, Wissenschaftsverlag Wien/Zürich

60) Fürbeth, M., Adam, D., (1976): Die Bedeutung von Serumbestandteilen, insbesondere Komplement, Properidin, Transferrin für die antibacterielle Wachstumshemmung von Humanserum. Infection, 4, 102-106

61) Garrtett, E.R., Hinderling, P.H., (1976): Pharmacokinetics and pharmacological interactions of antibacterial drugs. Chemotherapy, 4, 393-406

62) Garrett, E.R., Miller, G.H., (1965): Kinetics and Mechanisms of action of antibiotics on microorganisms III, J. Pharm. Sci., 54, 427-431

63) Garrett, E.R., Miller, G.H., Brown, M.R.W., (1966): Kinetics and mechanisms of action of antibiotics on microorganisms V J. Pharm. Sci., 55, 593-600

64) Garrod, L.P., Waterworth, P.M., (1969): Effect of medium composition on the apparent sensitivity of Pseudomonas aeruginosa to Gentamycin. J. Clin. Pathol., 22, 534-538

65) Garzone, P., Lyon, J., (1981): Steady-state Moxalactam kinetics: comparison with other Cephalosporins. Clin. Pharmacol. Ther., 30, 86-94

66) Gau, W., Horster, F.A., (1979): HPLC Analyse von Azlocillin und sein Penicilloat im Urin. Arzneimittelforschung, 29, 1941-1943

67) Gaya, H., et al., (1983): Synergism and antagonism of antibiotic combinations. 13th Intern. Congress of Chemother., Proceedings, 44

68) Gibaldi, M., Schwarz, M.A., (1968): Influence of Probenicid on the pharmacokinetics of Ampicillin, Nafcillin and Ancillin. Clin. Pharmacol. Ther., 9, 345-349

69) Gilbert, D.N., Kutscher, E., et al., (1971): Effect of the concentrations of magnesium and calcium on the vitro susceptibility of Pseudomonas to Gentamycin. J. Inf. Dis., 124, (Suppl.), 37-45

70) Gitlin, D., (1968): Host factors in resistance to infection. XIIth Int. Congr. Paed., Proc., Proc., Vol. II

71) Gitlin, D., (1968): Human host factors in resistance to bacterial infections. J. Bacteriology, 96, 2150-2156

72) Gladtke, E., Hattingberg, H.M., (1977): Pharmakokinetik, II. Auflage, Springer Verlag

73) Goldmann, P.L., Petersdorf, R.G., (1979): Significance of Methicillin - tolerance in experimental staphylococcal endocarditis. J. Antimicrob. Agents Chemother., 15, 802-806

74) Goodman, L.S., Gilman, A., (1980): The pharmcological basis of therapeutics. 6. Ed., Macmilan Publ. Co.

75) Gorman, M., Ryan, Ch., (1972): Structure-activity relationship of β-lactam-antibiotics. Acad. Press N.Y. / London, 533-582

76) Greenblatt, D., Koch-Weser, J., (1975): Clinical pharmacokinetics, Part I / II, New England J. Med., 293, 702-705/964-970

77) Grumbach, A., Bonin, O., (1969):"Die Infektionskrankheiten des Menschen und ihre Erreger." Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart

78) Gscheidlein, N., Traube, M., (1874): Über Fäulnisse und den Widerstand der lebenden Organismen gegen dieselbe. 52. Jahresbericht der schlesischen Gesellschaft für vaterländische Kultur, 179

79) Gundert-Remy, U., Weber, E., (1982): Elimination of Azlocillin in patients with biliary T-tube drainage. Europ. J. Clin. Pharmacol., 22, 435-439

80) Harris, A.H., Colemann, M.B., (1963): Diagnostic procedures and reagents. Amer. Publ. Health Ass., N.Y., 2. Ed.

81) Helm, E.B., Schacht, P., Shah, P.M., Stille, W., (1975): First clinical experiences with a new Ureido-Penicillin (Bay e 6905). 15th Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother., Washington D.C.

82) Helm, E.B., Shah, P.M., Stille, W., (1977): Antibakterielle Aktivität von Antibiotika in Körperflüssigkeiten. Johann A. Wülfing, Neuss

83) Hennessy, T.D., (1967): Inducible - lactamase in Enterobacter. J. Gen. Microbiol., 49, 277-285

84) Hitzenberger, G., (1970): Pharmacokinetics of Benzylpenicillin and Oxacillin in combined application. Int. J. Clin. Pharmacology, 3, 105-112

85) Humbert, G., Leroy, A., Fillastre, J.P., (1983): Pharmacokinetics of Moxalactam in adults. Sem. Hop. Paris, 59, 1963-1967

86) Hunter, T.H., (1946): The tratment of bacterial endocarditis with antibiotics. Amer. J. Med., 1, 83

87) Israel, K.S., Black, H.R., Brier, G.L., et al., (1982): Single and multiple-dose pharmacokinetics of Moxalactam in normal subjects. J. Antimicrob. Agents Chemother., 22, 94-102

88) Jawetz, E., (1953/1954): Combined antibiotc action. Experimental and Clinical Antibiotic Annual, 53/54, 41-45

89) Jawetz, E., (1962): Assay of antibacterial activity in serum. Amer. J. Dis. Child., 103, 113-116

90) Jawetz, E., (1959): Combined antibiotic therapy in serious infections caused by drug resistent Staphylococci. Arch. Int. Med., 163, 289-307

91) Jawetz, E., Gunnison, J.B., (1952): Studies on antibiotic synergism and antagonism: A scheme of combined action. Antibiot. Chemother., 2, 243

92) Jendroček, T., Dissertationsarbeit, Berlin, pers. Rücksprache

93) Jones, R.N., Fuchs, P.C., Sommer, H.M., et al. (1980): Moxalactam, a new semi-synthetic 1-Oxa-β-lactam-antibiotic with remarkable antimicrobial activity. J. Antimicrob. Agents Chemother., 17, 750-756

94) Kabizuka, S.V., Desser, K.B. (1976): Carbenicillin associated hypokaliemic alkaloses. J. Amer. Med. Ass., 236, 956

95) Kaplan, S.L., Mason, E.O., Garcia, H., et al. (1981): Pharmacokinetics and cerebrospinal fluid penetration of Moxalactam in children with bacterial meningitis. J. Pediatrics, 98, 152-157

96) Kapusnic, J.E., et al. (1982): Drug interactions newsletter, 2, (9), 35-40

97) Kemmerich, B. (1977): Sisomycin - Vergleichende pharmkologische und klinische Untersuchungen über ein neues Aminoglykosid Antibiotikum. Inaugural Dissertation Berlin

98) Kemmerich, B., Lode, H., Belmega, G., Jendroček, T., Borner, K., Koeppe, P. (1983): Comparative pharmacokinetics of Cefoperazone, Cefotaxim and Moxalactam. J. Antimicrob. Agents Chemother., 23, 429-434

99) Klasterski, J. (1983): Clinical significance of the serum bactericidal activity. Proceedings part 4, 13th Int. Congress of Chemother, Wien

100) Klastersky, J. (1977): Significance of antimicrobial synergism for the outcome of gramnegative sepsis. Am. J. Med. Sci., 273, 157-167

101) Klastersky, J. Swings, G., Daneau, D. (1970): Antimicrobial activity of the Carbenicillin / Gentamycin combination against gramnegative bacilli. Am. J. Med. Sci., 260, 373-380

102) Klastersky, J., Cappal, R., et al. (1971): Evaluation of Gentamycin with Carbenicillin in infections due to gramnegative bacilli. Curr. Therapeutic Res., 13, 174-180

103) Klastersky, J., Cappal, R., Daneau, D. (1972): Clinical significance on in vitro synergism between antibiotics in gramnegative infections. J. Antimicrob. Agents Chemother., 2, 470-475

104) Klastersky, J., Cappal, R., Swings, G., Vandenborre, L. (1971): Bacteriological and clinical activity of the Ampillicillin / Gentamycin and Cephalotin / Gentamycin combinations. Amer. J. Med. Sci., 262, 283-289

105) Klastersky, J., Daneau, D., Swings, G. (1974): Antibacterial activity in serum an urine as a therapeutic guide in bacterial infections. J. Infect. Dis., 129, 187-193

106) Klastersky, J., Hensgens, L., Meuner-Carpenter, F. (1976): Comparative effectiveness of combinations of Amikacin with Penicillin G and Amikacin with Carbenicillin in gramnegative septicemia. J. Infect. Dis., 134, (Suppl.), 433-440

107) Klein, P. (1957): Bacteriologische Grundlagen der chemotherapeutischen Laboratoriumspraxis, Springer Verlag Berlin / Heidelberg

108) Klein, M., Kimmelman, J.L. (1947): The correlation between the inhibition of drug resistance and synergism in Streptomycin and Penicillin. J. Bact., 54, 363

109) Koch - Weser, J. (1974): Bioaviability of drugs, part I + II, New England J. of Med., 291, 233-237, 503-508

110) Koeppe, P.: Programmbeschreibung LØ 2, unveröffentlicht

111) Koeppe, P., Hamann, C. (1978): Zwei Methoden zur Parameterschätzung nichtlinearer Regressionsfunktionen bei fehlerbehafteten Meßdaten. EDV in Medizin und Biologie, 9, 112-117

112) Koeppe, P., Höffler, D. (1972): Die Verwendung eines Digitalrechners zur Entwicklung von Dosierungsempfehlungen für eine Therapie mit Antibiotika. Arzneimittelforschung, 22, 311-319

113) König, H.B., Metzger, R.P., Mürmann, R.P., Offe, H.A., Schacht, P. (1977): Azlocillin - ein neues Penicillin gegen Pseudomonas aeruginosa und andere gramnegative Bakterien. Infection, 5, 170-182

114) König, H.B., Metzger, K., Offe, H.A., Schröck, W. (1979): New acylureidopenicillins, active against gramnegative bacteria. 14th Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother., San Francisco

115) Kuck, N.A., Testa, R.T., Forbes, M. (1980): In vitro and in vivo antibacterial effects of combinations of β-lactam-antibiotics. 20th Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother., New Orleans

116) Kunin, C.M. (1966): Clinical pharmacologie of new penicillins I: The importance of serum proteinbinding in determining antimicrobial activity and concentration in serum. Clin. Pharm., 7, 166-179

117) Kunin, C.M., Craig, W.A., Kornguth, M., Mouson, R. (1973); Influence of binding on the pharmacologic activity of antibiotics. Ann. N.Y. Acad. Sci., 226, 214-224

118) Kurihara, J., Matsumoto, K., Uzuka, Y. (1978): Human pharmacokinetics of 6059-S. Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother. 18th, Atlanta, Ga.

119) Lacey, B.W. (1958): Mechanism of chemotherapeutic synergy. Sympos. Soc. Gen. Microbiol., 8, 247-288

120) Leive, L. (1965): Actinomycin sensitivity in E. coli produced by EDTA. Biochem. Biophys. Res. Commun., 18. 13-17

121) Leroy, A., Humbert, G., Fillastre, J.P. (1981): Pharmacokinetics of Azlocillin in healthy subjects. Scand. J. Infect. Dis. (Suppl.), 29, 49-54

122) Leroy, A., Humbert, G., Fillastre, J.P. (1981): Pharmacokinetics of Moxalactam in subjects with normal and impaired renal functions. J. Antimicrob. Agents Chemother., 19, 956-971

123) Leroy, A., Humbert, G., Godin, M., Fillastre, J.P. (1980): Pharmacokinetics of Azlocillin in subjects with normal and impaired renal functions, J. Antimicrob. Agents Chemother., 17, 344-349

124) Lode, H. (1977): Untersuchungen zur enteralen Resorbtion von β-Lactam-Antibiotika. Habilitationsschrift, Berlin

125) Lode, H., Naumann, P. (1974): Untersuchungen zur in vitro Wirkung von Cephalotin, Gentamycin und ihrer Kombination gegen Proteus mirabilis und Enterokokken. Advanced Clin. Pharmacol., 8, 46-49

126) Lode, H., Naumann, P. (1974): Untersuchungen zur in vitro Wirkung von Cephalotin, Gentamycin und ihrer Kombination gegen Proteus mirabilis und Enterokokken. Advanced Clin. Pharmacology, 8, 46-50

127) Lode, H., Niestrath, U., Koeppe, P., Langmaak, H. (1977): Azlocillin und Mezlocillin, zwei neue semisynthetische Acylureido-Penicilline. Infection, 5, 163-169

128) Lode, H., Thomas, W., Koeppe, P., Wagner, J. (1980): Clinical pharmacology of a new Ureidopenicillin BAY K 49999. Chemotherapy, 26, 81-90

129) Loewe, S. (1953): The problem of synergy and antagonism of combined drugs. Arzneimittelforschung, 3, 285-290

130) Lorian, V. (1980): Antibiotics in laboratory Medicine. M.D. New York

131) Luboshitzky, R., Sachs, T., Michel, J. (1973): Bactericidal effects to combinations of antibiotics on Klebsiella-Enterobacter-Serratia. Chemotherapy, 19, 354-366

132) Lüthy, R., Blaser, J., Bonetti, A., Simmen, H.P., Wise, R., Siegenthaler, W. (1981): Comparative multiple dose pharmacokinetics of Cefotaxime, Moxalactam and Ceftazidime. J. Antimicrob. Agents Chemother., 20, 567-575

133) Malottke, R. (1980): Bakteriologische Untersuchungen mit einem neuen halbsynthetischen Oxa-β-Lactam-Antibiotikum, LY 127935. Infection, 8, 43-45

134) Markowitz, S.M., Sibilla, D.J. (1981): Comparative susceptibilities of clinical isolates of Serratia marcescens to newer Cephalosporines, alone and in combination with various Aminoglycosides. J. Antimicrob. Agents Chemother., 18, 651-655

135) Martin, H.H. (1981): Die Bedeutung der Penicillin-Bindungsproteine in der Bakterienzytoplasmamembran. Immunolog. Infect., 9 / 3, 99-105

136) Marymont, J.H., Wentz, R.M. (1966): Serial dilution antibiotic sensitivity testing with the microtitrator system. Amer. J. Clin. Path. 45, 548-551

137) Mason, E.O., Kaplan, I.R., Anderson, S.L., et al. (1980): In vitro susceptibility of 104 clinical isolates of Haemophilus influenzae to Moxalactam, Ampicillin, Chloramphenicol and Ticarcillin. J. Antimicrob. Agents Chemother., 17, 470-473

138) Medeiros, A.A., O'Brien, T.F., et al. (1971): Effect of salt concentration on the apparent in vitro susceptibility of Pseudomonas and other gramnegative bacilli to Gentamycin. J. Infect. Dis., 124, 59-64

139) Mikrobiologisches Handbuch. Becton Dickson, Deutschland, Heidelberg

140) Modr, Z.D., Dworoček, K. (1976): Pharmakokinetik der Antibiotika, Deutsches Gesundheitswesen, 31 (4), 145-154

141) Modr, Z.D., Dvoroček, K., Jank, J., Krebs, V. (1982): Azlocillin, ein neues Anti-Pseudomonas-Penicillin. Infection, 10, (Suppl. 3), 184-190

142) Moxalactam, Eli Lilly GMBH, Informationsbroschüre

143) Mueller, H.J., Hinton, J. (1941): A protein free medium for primary isolation of the Gonococcus and Meningococcus. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 48, 330-333

144) National Committee on Clinical Laboratory Standards (1975): Performance standards for antimicrobial disc susceptibility test.

145) Naumann, P. (1962): Antibiotika - Blutspiegel und Resistenzbestimmung Antimicrob. Chemother., 10, 1-93

146) Naumann, P. (1974): Zum gegenwärtigen Stand einer Standardisierung der Resistenzbestimmung in Deutschland. Infection, 2, 52-55

147) Naumann, P., Lode, H., Reintjens, E. (1973): Zur Kombinationsbehandlung mit Penicillinen, Arzneimittelforschg., 23, 218-225

148) Neuhaus, B. (1981): Durch Cephalosporine induzierbare Resistenz gegen Penicillinabkömmlinge bei Enterobacteriaceae und Pseudomonaceae-in: Kombination von β-Lactam-Antibiotika, Zuckschwert Verlag München

149) Nicaido, H., Decad, G.M. (1976): Outer membran of gramnegative bacteria, XII Molecular sieving function of cell wall. J. Bacteriol., 128, 325-336

150) Otsuka, H., Nagata, W., Yoshioka, M. et al. (1981): Discovery and developement of Moxalactam (6059-s). Med. Res. Rev., 1, 217-248

151) Otte, H.J., Brandis, H. (1978): Lehrbuch der Mikrobiologie. 4. Aufl., G. Fischer Verlag, Stuttgart

152) Parsons, I.N., Romano, J.M., Levison, M.E. (1980): Pharmacology of a new 1-Oxa-β-Lactam (LY 127935) in normal volunteers. J. Antimicrob. Agents Chemother., 17, 226-228

153) Peterson, L.R., Bean, B., et al. (1981): Pharmacokinetic, protein-binding and predicted extravascular distribution of Moxalactam in normal and renal failure subjects. J. Antimicrob. Agents Chemother., 20, 378-381

154) Pien, F.D., Vosti, K.L. (1974): Variation in performance of the serum bactericidal test. J. Antimicrob. Agents Chemother., 6, 330-333

155) Pien, F.D., Williams, R.D., Vosti, K.L. (1975): Comparison of broth and human serum as diluent in the serum bactericidal test. J. Antimicrob. Agents Chemother., 7, 113-114

156) Polk, R.E., Kline, B.J., Markowitz, S.M. (1981): Cefazolin and Moxalactam pharmacokinetics after simultaneous intravenous infusion. J. Antimicrob. Agents Chemother., 20, 576-579

157) Prober, C.G., Daughtery, S.S., Vosti, K.L., Yeager, A.S., (1979): Comparison of micromethod for performance of the serum bactericidal test, with the standard tube dilution method. J. Antimicrob. Agents Chemother., 16, 46-48

158) Pulverer, G., Peters, G. (1982): Zum Wirkungsspektrum der neuen Cephalosporin- Antibiotika Cefoxitin, Cefoperazon und Lamoxactam. Med. Welt 33, 17, 642-644

159) Ratschow, R., Krone, J.R., (1977): Untersuchungen über den Einfluß von Humanserum auf die in vitro Activität verschiedener Cephalosporine. Infection, 5, 236-241

160) Reeves, D.S., Bywater, M.J. (1976): Assay of antimicrobial agents. Selected topics in clinical bacteriology, J. de Louvois, ed. Bailliere Tyndall, London

161) Richmond, M.H., Sykes, R.B. (1973): The β-Lactamases of gramnegative bacteria and their possible physiologic role. Advanced Microbiol. / Acad. Press N.Y. / London, 31-881

162) Ritschel, W.A. (1970): Applied biopharmaceutics II, University of Cincinnati, 879

163) Roantree, R.J., Rantz, L.A. (1960): A study of the relationship of the normal bactericidal activity of human serum to bacterial infections. J. Clin. Invest., 39, 73

164) Rolinson, G.N., Sutherland, R., Howall, A. (1972): Effect of protein-binding on levels of Ampicillin and Cloxacillin in synovial fluid. Clin. Pharmacol. Ther., 13, 724-732

165) Rowley, D. (1960): Antibacterial systems of serum in relation to non-specific immunity to infections. Bacteriol. Rev., 20, 106

166) Ruttkowski, E., Martin, H.H. (1981): Synergismus der Hemmwirkung spezieller Kombinationen von /3-Lactam-Antibiotika auf Wachstum und Zellwandbiosynthese von Proteus mirabilis - in: Kombination von /3-Lactam-Antibiotika, Zuckschwerdt Verlag München

167) Ryan, K.J., Schoenknecht, F.D., Kirby, W.M.M. (1970): Disc sensitivity testing. Appl. Microbiol., 19, 1014-1016

168) Sabath, L.D. (1979): Staphylococcal tolerance to Penicillins and Cephalosporins - in: Schlessinger, ed. Microbiol., Amer. Soc. Microbiol., 299-303

169) Sabath, L.D., Abraham, E.P. (1964): Synergistic action of Penicillins and Cephalosporins against Pseudomonas pyocyanea. Nature-London, 204, 1066-1069

170) Sabath, L.D., Elder, H.A., Mc Call, C.E., Finland, M. (1967): Synergistic combinations of Penicillins in the treatment of bacteriuria. N. Engl. J. Med., 277, 232-240

171) Sabath, L.D., Wheeler, N., Laverdier, M. (1977): A new type of Penicillin resistance of Staph. aureus. Lancet, 1, 443-447

172) Sachs, L. (1972): Statistische Auswertungsmethoden. 3. Auflage Springer Verlag Berlin / Heidelberg

173) Sanders, C.C. (1979): Emergence of resistance among Cephalosporins. J. Antimicrob. Agents Chemother., 15, 792-797

174) Sanders, C.C. (1983): Interactions between /3-Lactam-antibiotics in vitro and in animal models of infection. 13th Intern. Congr. Chemother., proceedings part 44,

175) Sassiver, M.L., Lewis, A. (1977): Structure activity relationship among semisynthetic Cephalosporins. Acad. Press N.Y. / London, 87-160

176) Scheld, W.M., Spyker, D.A., Donowitz, G.R., Bolton, W.K., Sande, N.A. (1981): Moxalactam and Cefazolin - comparative pharmacokinetics in normal subjects. J. Antimicrob. Agents Chemother., 19, 613-619

177) Schimpff, S.C., Satterlee, W., Young, V.M. (1971): Empiric therapy with Carbenicillin and Gentamycin for febrile patients with cancer and granulocytopenia. N. Engl. J. Med., 284, 1061-1065

178) Schlichter, J.G., Mc Lean, H. (1947): A method for determining the effective therapeutic level in the treatment of subacute bacterial endocarditis with Penicillin. Am. Heart J., 34, 209-211

179) Schlichter, J.G., Mc Lean, H. Malser, A. (1949): Effective Penicillin therapy in subacute bacterial endocarditis and other chronic infections. Am. J. Med. Sci., 217, 600-608

180) Scholten, W., Schmid, J. (1962/1963): Bindung der Penicilline an die Eiweißkörper des Serums und Gewebes, I, II, III. Arzneimittelforschg. 12/13, 741, 288, 347

181) Secorupen, Bayer Leverkusen, Informationsbroschüre

182) Seelemann, M. (1954): Biologie der Streptokokken, 2. Aufl. Hans Carl Verlag, Nürnberg

183) Sedlak, J., Rische, H. (1967): Enterobacteriaceae Infectionen. Edition Leipzig

184) Shah, P. (1971): Untersuchungen zur Kinetik der Bakterizidie bei Enterobakterien. Dissertation, Frankfurt

185) Shah, P. (1979): Die lückenlose Breitsprektrum-Therapie als neues Konzept der antibacteriellen Chemotherapie. Habilitationsschrift, Frankfurt

186) Shimada, J., Ueda, Y. (1982): Moxalactam - absorbtion, excretion, distribution and metabolism. Rev. Infect. Dis., 4, (Suppl.), 569-580

187) Simon, C., Stille, W. (1979): Antibiotica Therapie - in Klinik und Praxis. Schattauer Verlag, Stuttgart

188) Skalova, R. (1980): In vitro antibacterial activity of Moxalactam, a new antibiotic with a broad spectrum. Infection, 8, (Suppl. 3), 330-333

189) Skarnes, R.C., Watson, D.W. (1960): Antibacterial factors of normal tissue and fluids. Bacteriol. Rev., 20, 106

190) Smith, C.B., Daus, P.E. et al. (1969): Use of Gentamycin in combinations with other antibiotics. J. Infect. Dis., 119, 370-377

191) Smith, M.R., Shin, H.S., Wood, W.B. (1963): Natural immunity bo bacterial infections: the relation of complement to heat labile opsonins. Proc. Nat. Acad. Sci., 1151

192) Sonne, M., Jawetz, E. (1969): Combined actions of Carbenicillin and Gentamycin on Pseudomonas in vitro. Appl Microbiol., 17, 893-896

193) Spratt, B.G. (1980): Biochemical and genetical approaches to the mechanism of action of Penicillin. Phil. Trans. R. Soc., London, 289, 273

194) Srinivasan, S., Fu, K.P., Neu, H.C. (1981): Pharmacokinetics of Moxalactam and Cefazolin compared in normal volunteers. J. Antimicrob. Agents Chemother., 19, 302-305

195) Stahlmann, R. (1981): Pharmakokinetic und therapeutische Anwendung neuer oraler Cephalosporinderivate. Dissertation, Berlin

196) Staszewski, S., Restle, A., Stille, W. (1983): Combinations of Piperacillin with Cephalosporin antibiotics. 13th Int. Congr. Chemother., proceeding part 84

197) Stille, W., Uftelmann, H. (1973): Untersuchungen über den paradoxen bakteriziden Effekt von Penicillin auf Enterokokken. Dtsch. Med. Woschr., 98, 611

198) Stratton, C.W., Barth-Reller, L. (1977): Serum dilution test for bactericidal activity: I Selection of a physiologic diluent. J. Infect. Dis., 136, 187-195

199) Strominger, J.L. (1970): Antibiotics as inhibitors of bacterial cell wall synthesis. J. Antimicrob. Agents Chemother., annual, 328-331

200) Sutherland, R., Batchelor, F.R. (1964): Synergistic activity of Penicillins against Penicillinase producing gramnegative bacilli. Nature/ London, 201, 868-869

201) Thomas, L., Gaven, M.D., Town, M.A. (1970): A microdilution method for antibiotic susceptibility testing. Appl. Microbiol., 19, 880-885

202) Traub, W.H., Sherris, J.C. (1983): Studies on the interaction between serum bactericidal activity and antibiotics in vitro. Chemother., 15, 70-83

203) Wasielewski, E. (1967): Zum Problem der bakteriellen Persistenz. Internist, 8, 204-208

204) Weiser, R.A., Asscher, A.W., Wimpenny, J. (1968): In vitro reversal of antibiotic resistance by ethylenediamine - tetraacetic acid. Nature, 219, 1365-1366

205) Williams, J. (1957): Regression analyses, John Wiley and sons, New York

206) Wilson, L.A., Spitznagel, J.K. (1968): Molecular and structural damage to E. coli produced by antibody, complement and lysozyme systems. J. Bacteriol., 96, 1339-1348

207) Wirth, K., Schomerus, M., Hengstmann, J.H. (1976): Zur Pharmakokinetik von Azlocillin, einem neuen semisynthetischen Breitspektrum Penicillin. Infection, 4, 25-30

208) Wise, E.M., Park, J.T. (1965): Penicillin - its basic site of action as an inhibitor of a peptid - cross - linking reaction in cell wall mucopeptid Syntheses. Proc. Nat. Acad. Sci. 54, 75-81

209) Wise, R., Andrews, J.M., Bedford, K.A. (1979): LY 127935, an in vitro comparison with other β-lactam-antibiotics. J. Antimicrob. Agents Chemother., 16, 341-345

210) Wise, R., Baker, S., Livingstone, R. (1980): Comparison of Cefotaxime and Moxalactam pharmacokinetics and tissue levels. J. Antimicrob. Agents Chemother., 18, 369-371

211) Wise, R., Baker, S., Wright, N., Livingstone, R. (1980): The pharmacokinetics of LY 127935. J. Antimicrob. Agents Chemother., 18, 319-322

212) Wise, R., Gillet, A.P., Andrews, I.M. (1979): The in vitro activity of Mezlocillin when combined with Cefoxitin or Clavulanic acid. J. Antimicrob. Agents Chemother., 5, 301-306

213) Wise, R., Wills, P.J., Bedford, K.A. (1981): Epimeres of Moxalactam: in vitro comparison of activity and stability. J. Antimicrob. Agents Chemother., 20, 30-32

214) Wittmann, D.H., Schassan, H.H. (1981): Pharmakokinetische Untersuchungen von Azlocillin und Mezlocillin in den Knochen und in der Gewebsflüssigkeit. Arzneimittelforschg., 31, 1157-1162

215) Zimelis, V.M., Jackson, G.G. (1973): Activity of Aminoglycosides against Pseudomonas aeruginosa, specificity and site of Calcium and Magnesium antagonism. J. Infect. Dis., 127, 663-696

216) Loo, J.C.K., Riegelmann, S. (1970): Assacement of pharmacokinetic constants from post infusion blood curves obtained after i.v. infusion. J. Pharmaceut. Sci., 59, 53-57

217) Buchner, H. (1889): Über die bakterientötende Wirkung des zellfreien Blutserums. Zbl. Bakteriol., 6, 1

218) Lode, H. (1983): Combination therapy with β-lactam-antibiotics. Journal of Antimicrob. Chemotherapy, 12, 260-265

219) Wade, J.C., Schimpff, S.C. (1982): Antibiotic therapy for febrile granulocytopenic patients. Combination Antibiotic Therapy in the Compromised Host. (Klastersky, J., Stagnet, M.J. Eds.), 135-46, Raven Press, New York

220) Schimpff, S.C. (1982): Use of new β-lactam-antibiotics in the febrile neutropenic patient. Symposium paper, 22nd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Miami, October 5th

221) Bartmann, K. (1974): Antimikrobielle Chemotherapie. Springer Verlag Berlin

222) Hugo, W.B. (1971): Inhibition and destruction of the microbial cell. Academic Press, London

223) Kauffmann, F. (1975): Classification of bacteria. Ejnar Munksgard, Copenhagen

224) Urbaschek, B.R., Neter, E. (1975): Gramnegative bacteria infections. Springer Verlag, Wien

225) Zinner, S.H., Stone, B.B., Peter, G. (1983): Combination of β-lactam-antibiotics: Potential for in vitro and in vivo synergism and antagonism. Proceedings of 13th Int. Congress of Chemotherapy, Wien

226) Zinner, S.H., Klastersky, J., Gaya, H. (1981): In vitro and in vivo studies of three antibiotic combinations against gramnegative bacteria and Staphylococcus aureus. Antimicrob. Agents and Chemother. 20, 463-469

227) Sanders, C.C., Sanders, W.E., Goering, R.V. (1982): In vitro antagonism of β-lactam-antibiotics by Cefoxitin. Antimicrob. Agents and Chemother. 21, 968-975

228) Grimm, H. (1981): Bakteriologische Untersuchungen zur Kombination von β-Lactam-Antibiotika, in: Kombination von β-Lactam-Antibiotika, Zuckenschwerdt Verlag, München.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. H. Lode durchgeführt. Für seine Hilfsbereitschaft und seinen Rat möchte ich ihm danken.
Mein besonderer Dank gilt Frau Gisela Dzwillo für ihre ausgezeichnete Unterstützung im Labor.
Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Borner für die ergänzenden Untersuchungen mit der HPLC-Methode.
Auch Manuela Feike und meiner Mutter Frau Ruth Madey danke ich für die umfassende Mithilfe bei der Durchführung und den Schreibarbeiten.

Lebenslauf

persönliche Daten:	geboren am 11.2.1958	
	in Hamburg	
	Eltern: Ruth Madey	
	geb. Westphal	
	Wolfgang Madey	
Schulausbildung:	1965 - 1969	Volksschule Hamburg
	1969 - 1977	Peter-Petersen-Schule Hamburg
	1977	Abitur
Wehrdienst:	1977 - 1978	Sanitäter in Itzehoe
Studium:	SS 1978	Beginn des Humanmedizinstudiums an der Freien Universität Berlin
	SS 1980	Ärztliche Vorprüfung
	SS 1981	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
	WS 1983	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
	WS 1984	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
	4.12.1984	Approbation als Arzt

Papyrus-Druck GmbH Berlin ☎ 3416451
Dissertationen